

**Ischämische Postkonditionierung (IPostC) als neue  
Strategie zum Schutz verschiedener Modelle von  
Lebererkrankungen vor Ischämie-Reperfusionsschäden  
nach kalter und warmer Ischämie**

von Julia Schewe

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Ischämische Postkonditionierung (IPostC) als neue  
Strategie zum Schutz verschiedener Modelle von  
Lebererkrankungen vor Ischämie-Reperfusionsschäden  
nach kalter und warmer Ischämie**

von Julia Schewe  
aus Potsdam  
München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am Klinikum Großhadern, Medizinische Klinik und Poliklinik II

Mentor: PD Dr. Christian Steib

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

**Korreferent/en:** Priv.Doiz. Dr. Sonja Härtle

**Tag der Promotion: 18. Juli 2015**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber</b>	<b>1</b>
1.1.1	Klinischer Hintergrund	1
1.1.2	Pathomechanismen	2
<b>1.2</b>	<b>Methoden zur Reduzierung des Ischämie-Reperfusionsschadens</b>	<b>6</b>
1.2.1	Konservierungslösungen	6
1.2.2	Maschinenperfusion	6
1.2.3	Pharmakologische Interventionen	7
1.2.4	Gentherapie	8
1.2.5	Direkte ischämische Präkonditionierung	9
1.2.6	Indirekte ischämische Präkonditionierung	10
<b>1.3</b>	<b>Ischämische Postkonditionierung</b>	<b>11</b>
1.3.1	Entwicklung	11
1.3.2	Algorithmen	13
1.3.3	Molekulare Mechanismen	14
1.3.3.1	Überblick	14
1.3.3.2	Trigger	14
1.3.3.3	Mediatoren	16
1.3.3.4	Endeffektoren	17
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>20</b>

### 3 MATERIAL UND METHODEN \_\_\_\_\_ 22

#### 3.1 Isolierte Rattenleberperfusion *in situ* \_\_\_\_\_ 22

3.1.1 Tiere \_\_\_\_\_ 22

3.1.2 Reagenzien \_\_\_\_\_ 22

3.1.3 Durchführung \_\_\_\_\_ 22

3.1.4 Kalte Ischämie  $\pm$  IPostC \_\_\_\_\_ 23

3.1.5 Warme Ischämie  $\pm$  IPostC \_\_\_\_\_ 24

3.1.6 „Folgeperfusionen“ nach warmer Ischämie  $\pm$  IPostC \_\_\_\_\_ 25

#### 3.2 Lebermodelle für die isolierte

##### Rattenleberperfusion \_\_\_\_\_ 27

3.2.1 Fettleber \_\_\_\_\_ 27

3.2.2 Leberfibrose \_\_\_\_\_ 27

3.2.3 Leberzirrhose \_\_\_\_\_ 28

#### 3.3 *In vivo* Modell Ratte \_\_\_\_\_ 29

3.3.1 Tiere \_\_\_\_\_ 29

3.3.2 Durchführung \_\_\_\_\_ 29

#### 3.4 Histologische Untersuchungen \_\_\_\_\_ 31

3.4.1 Paraffin-Einbettung von Gewebe \_\_\_\_\_ 31

3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung \_\_\_\_\_ 31

3.4.2.1 Reagenzien \_\_\_\_\_ 32

3.4.2.2 Durchführung \_\_\_\_\_ 32

3.4.3 Elastica-van-Gieson-Färbung \_\_\_\_\_ 32

3.4.3.1 Reagenzien \_\_\_\_\_ 33

3.4.3.2 Durchführung \_\_\_\_\_ 33

3.4.4 Auswertung \_\_\_\_\_ 33

#### 3.5 Bestimmung der Laktatdehydrogenase

##### im Perfusat \_\_\_\_\_ 34

3.5.1 Reagenzien \_\_\_\_\_ 34

3.5.2 Durchführung \_\_\_\_\_ 34

<b>3.6</b>	<b>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</b>	
	<b>(ELISA)</b>	<b>35</b>
3.6.1	Thromboxan B <sub>2</sub> ELISA	35
3.6.1.1	Reagenzien und Materialien	35
3.6.1.2	Durchführung	36
3.6.2	Tumornekrosefaktor $\alpha$ ELISA	36
3.6.2.1	Reagenzien und Materialien	36
3.6.2.2	Durchführung	37
3.6.3	Interleukin 6 ELISA	37
3.6.3.1	Reagenzien und Materialien	38
3.6.3.2	Durchführung	38
<b>3.7</b>	<b>Bestimmung von klinischen-chemischen Parametern</b>	
	<b>im Serum</b>	<b>39</b>
3.7.1	Serumgewinnung	39
3.7.2	Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter	39
<b>3.8</b>	<b>Quantitative Reverse Transkription-Polymerase-</b>	
	<b>Kettenreaktion</b>	<b>40</b>
3.8.1	Gesamt-Ribonukleinsäure-Isolierung	40
3.8.1.1	Reagenzien und Materialien	40
3.8.1.2	Durchführung	41
3.8.1.3	Gesamt-Ribonukleinsäure-Quantifizierung	41
3.8.2	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure-Synthese	42
3.8.2.1	Reagenzien und Materialien	42
3.8.2.2	Durchführung	42
3.8.3	Custom RT <sup>2</sup> Profiler PCR Array	43
3.8.3.1	Reagenzien und Materialien	43
3.8.3.2	Durchführung	44
<b>3.9</b>	<b>Statistik</b>	<b>46</b>

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Histologische Auswertungen</b>	<b>47</b>
4.1.1	Kalte Ischämie <i>in situ</i> ± IPostC	47
4.1.2	Warme Ischämie <i>in situ</i> ± IPostC	50
4.1.3	Warme Ischämie <i>in vivo</i> ± IPostC	55
<b>4.2</b>	<b>Laktatdehydrogenase, Gallefluss und portaler Perfusionsdruck nach IPostC</b>	<b>58</b>
4.2.1	Kalte Ischämie <i>in situ</i> ± IPostC	58
4.2.2	Warme Ischämie <i>in situ</i> ± IPostC	64
4.2.3	„Folgeperfusionen“ nach warmer Ischämie <i>in situ</i> ± IPostC	70
<b>4.3</b>	<b>Thromboxan B<sub>2</sub> nach IPostC</b>	<b>72</b>
4.3.1	Kalte Ischämie <i>in situ</i> ± IPostC	72
4.3.2	Warme Ischämie <i>in situ</i> ± IPostC	74
<b>4.4</b>	<b>Parameter im Serum nach warmer Ischämie <i>in vivo</i> ± IPostC</b>	<b>77</b>
4.4.1	Transaminasen und Laktatdehydrogenase	77
4.4.2	Tumornekrosefaktor α und Interleukin 6	79
<b>4.5</b>	<b>Genexpressionen nach IPostC</b>	<b>81</b>
4.5.1	Kalte Ischämie <i>in situ</i> ± IPostC	82
4.5.2	Warme Ischämie <i>in situ</i> ± IPostC	85
4.5.3	Warme Ischämie <i>in vivo</i> ± IPostC	89
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>93</b>
<b>5.1</b>	<b>Histologie</b>	<b>93</b>
<b>5.2</b>	<b>Einfluss der IPostC auf Laktatdehydrogenase, Gallefluss und portalen Perfusionsdruck</b>	<b>95</b>
<b>5.3</b>	<b>Einfluss der IPostC auf „Folgeperfusionen“</b>	<b>98</b>



5.4	Einfluss der IPostC auf Thromboxan B <sub>2</sub>	99
5.5	Einfluss der IPostC auf Parameter im Serum	101
5.6	Einfluss der IPostC auf Genexpressionen	103
6	ZUSAMMENFASSUNG	107
7	SUMMARY	110
8	LITERATURVERZEICHNIS	113
9	ANHANG	128
9.1	Abkürzungsverzeichnis	128
9.2	Veröffentlichungen	133
10	DANKSAGUNG	134

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber

### 1.1.1 Klinischer Hintergrund

Lebererkrankungen wie eine chronische Virushepatitis, Leberzirrhose nach Alkoholabusus oder hepatozelluläre Karzinome (HCC) machen Transplantationen und Teilresektionen der Leber lebensnotwendig. Dabei entsteht infolge einer Unterbrechung der Blutzufuhr eine Ischämiephase und durch die erneute Durchblutung des Organs eine Reperusionsphase. Zusammen verursachen diese beiden Phasen den sogenannten Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI). Für die Ischämiephase wird zwischen kalter Ischämie (4°C über bis zu 24h), wie sie bei Lebertransplantationen vorkommt, und warmer Ischämie (37°C über 1-2h), die bei Teilresektionen der Leber erzeugt wird, unterschieden.

Zum ersten Mal wurde dieser Prozess von Toledo-Pereyra et. al **[136]** im Jahre 1975 beschrieben.

IRI verschlechtert die Organfunktion und kann so zu Leberversagen führen und das Überleben des Patienten nach Lebertransplantation oder –resektion gefährden bzw. eine Retransplantation erforderlich machen **[4, 106]**.

Dazu kommt vor allem in Bezug auf Transplantationen, dass aufgrund des enormen Organmangels auch minderwertige Lebern verwendet werden müssen. Das sind z.B. Lebern von älteren Spendern oder Fettlebern. Diese bereits vorgeschädigten Organe haben eine noch stärkere Anfälligkeit gegenüber IRI als gesunde Lebern **[11, 89, 138]** und die Gefahr der Dysfunktion ist daher umso größer.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, auf der Grundlage bereits bekannter Mechanismen des IRI, Möglichkeiten zum Schutz der Leber vor diesem zu entwickeln und klinisch anzuwenden. Nur so kann das Angebot an verfügbaren Organen erweitert und optimal genutzt werden.

### 1.1.2 Pathomechanismen

Die Ischämiephase (**Bild 1.1**) beginnt mit der Unterbrechung der Blutzufuhr, was gleichzeitig eine Unterbrechung der Sauerstoffversorgung der Zellen bedeutet. Die Energiereserven in Form von Adenosintriphosphat (ATP) werden aufgebraucht und stehen nicht länger für Iontentransporter wie die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und Enzyme bereit. Die Gleichgewichte für  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  werden verschoben, wodurch die Regulation des Zellvolumens nicht mehr gewährleistet ist und die Sinusendothelzellen (SEC) und Kupfferzellen (KCs) anschwellen [87]. Außerdem ist das Verhältnis von Stickstoffmonoxid (NO, Vasodilatator) und Endothelin (erhöht, Vasokonstriktor) verschoben und führt zusammen mit einer verstärkten Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ )-produktion und dem Anschwellen der Zellen zu einer Verengung der Lebersinusoiden, beeinträchtigt somit die Mikrozirkulation und akkumuliert und aktiviert neutrophile Granulozyten und KCs [102, 105]. Die aktivierten KCs setzen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ), Interleukin 1 (IL 1) und Interleukin 6 (IL 6) frei, wobei vor allem  $\text{TNF}\alpha$  und die ROS mithilfe von Adhäsionsmolekülen zur verstärkten Bindung der Neutrophilen an das Endothel und deren Wanderung in das Gewebe beitragen [62, 105]. Dort setzen diese wiederum ROS, den Plättchenaktivierenden Faktor (PAF), Leukotriene und Proteasen frei [54].

Eine sehr bedeutende Quelle für proinflammatorische Zytokine in KCs und Neutrophilen ist das NLRP3 Inflammasom. Dabei handelt es sich um einen Proteinkomplex des unspezifischen Immunsystems, der durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), einen erhöhten intrazellulären Kaliumspiegel oder ROS aktiviert werden kann [129]. Dies führt zur Autokatalyse von pro-Caspase 1 zu Caspase 1, welche anschließend die Zytokin-Vorstufen pro-IL 1 $\beta$  und pro-IL 18 zu IL 1 $\beta$  und IL 18 umsetzt und so durch Akkumulation und Aktivierung von Immunzellen zum Ausmaß des IRI beiträgt [129].

Zusätzlich rekrutieren und aktivieren IL 1 und  $\text{TNF}\alpha$   $\text{CD4}^+$  T-Lymphozyten, welche wiederum  $\text{INF}\gamma$  und Tumornekrosefaktor  $\beta$  ( $\text{TNF}\beta$ ) bilden und zusätzlich KCs und Neutrophile akkumulieren und aktivieren sowie die Hepatozyten zur Bildung von Chemokinen anregen [2, 14].

ROS und proinflammatorische Zytokine stimulieren außerdem Hepatozyten zur Bildung von ROS und aktivieren auch die SECs, was zur Expression des

interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM 1) und des vaskulären Adhäsionsmoleküls 1 (VCAM 1) auf der Zelloberfläche führt, so dass die Neutrophilen mithilfe von L-Selectin und  $\beta_2$ -Integrinen in das Lebergewebe eindringen und schädigen können [2].

Der Hauptanteil der ROS wird über den Xanthin-Dehydrogenase (XDH)/Xanthin-Oxidase (XOD) – Signalweg in den Mitochondrien und aktivierten SECs und Hepatozyten gebildet [98]. ROS schädigen durch Lipidperoxidation die Zellmembranen und führen so zu Störungen des Ionen-Gleichgewichts, Zellschwellung und sowohl apoptotischem als auch nekrotischem Zelltod [55]. Aber ROS zerstören nicht nur die Plasmamembran, sondern auch intrazelluläre Organellen, wie die Mitochondrien und den Zellkern. So wird durch die Schädigung von Enzymkomplexen der Atmungskette die ATP-Produktion gestört und Cytochrom c wird in das Zytosol freigesetzt und löst die Apoptose aus [158].

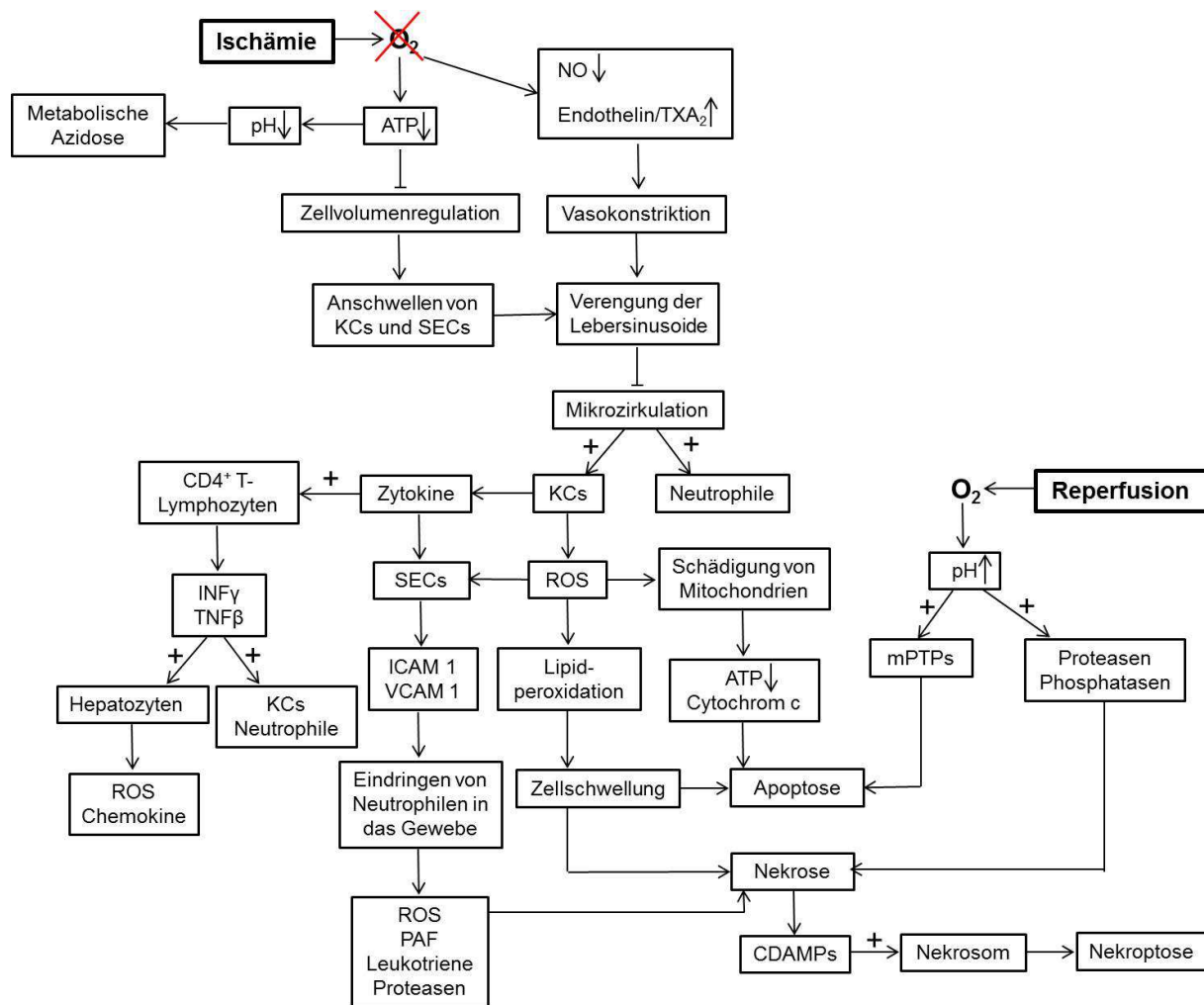
Eine wichtige Rolle im Pathomechanismus des IRI spielt auch der pH-Wert. Während der Ischämie wird der Stoffwechsel von aerob auf anaerob umgestellt, so dass sich saure Metaboliten, wie Milchsäure und Ketonkörper, die aus der gesteigerten anaeroben Glykolyse stammen, ansammeln [40]. Das bedeutet, dass der pH-Wert sinkt und sich eine metabolische Azidose entwickelt. Mit dem Start der Reperfusion (**Bild 1.1**) gelangt neuer Sauerstoff für alle oxidativen Prozesse in das Gewebe, der pH-Wert normalisiert sich wieder und führt zur Aktivierung von pH-abhängigen Enzymen (wie z.B. Proteasen und Phosphatasen), die die Schädigung des Gewebes fortsetzen und verschlimmern [40].

Mit dem Anstieg des pH-Wertes zu Beginn der Reperfusion werden auch die Mitochondrien-Permeabilitäts-Transitions-Poren (mPTPs) aktiviert, öffnen sich und tragen so zum IRI bei [62].

Es handelt sich bei mPTPs um spannungsabhängige Poren, die in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind und sich infolge erhöhten oxidativen Stresses und Kalzium-Überschuss öffnen [110]. Es kommt zum Einstrom kleiner Moleküle per Osmose, was zu einem Anschwellen der Mitochondrien bis zum Rupturieren der äußeren mitochondrialen Membran führt. Somit werden proapoptotische Faktoren in das Zytoplasma abgegeben und das Membranpotential kann nicht länger aufrechterhalten werden [110].

Doch nicht nur Apoptose und Nekrose tragen zum Zelluntergang während Ischämie und Reperfusion bei, auch die Nekroptose hat vermutlich einen großen Anteil daran.

Bei der Nekroptose handelt es sich um eine kontrollierte Nekrose, die durch die Bildung eines Nekrosoms aus den Rezeptor-interagierenden Proteinkinasen 1 und 3 (Ripk1 und Ripk3) reguliert wird **[36]**. Auch Caspase 8 scheint in diesem Komplex relevant zu sein, wobei Ripk1 und Caspase 8 auch mit der Apoptose assoziiert werden, während Ripk3 vorrangig mit der Nekroptose verbunden ist **[161]**. Es wurde beschrieben, dass die Aktivierung von Caspase 8 Ripk1 und Ripk3 spaltet und somit die Apoptose eintritt, eine Hemmung jedoch führt durch Verbindung von Ripk1 und Ripk3 zum Nekrosom **[84]**. Initiiert wird die Nekroptose wahrscheinlich durch die Freisetzung Zelltod-assoziiierter molekularer Muster (CDAMPs) infolge des Zelltodes durch Nekrose **[78]**.



**Bild 1.1: Pathomechanismen des IRI**

**ATP:** Adenosintriphosphat; **CDAMP:** Zelltod-assoziierte molekulare Muster; **ICAM 1:** Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1; **INFγ:** Interferon γ; **KC:** Kupfferzelle; **mPTP:** Mitochondrien-Permeabilitäts-Transitions-Poren; **NO:** Stickstoffmonoxid; **O<sub>2</sub>:** Sauerstoff; **PAF:** Plättchenaktivierender Faktor; **ROS:** Reaktive Sauerstoffspezies; **SEC:** Sinusendothelzelle; **TNFβ:** Tumornekrosefaktor β; **TXA<sub>2</sub>:** Thromboxan A<sub>2</sub>; **VCAM 1:** Vaskuläres Adhäsionsmolekül 1.

## 1.2 Methoden zur Reduzierung des Ischämie-Reperfusionsschadens

### 1.2.1 Konservierungslösungen

Bei Lebertransplantationen muss das Organ nach der Entnahme aus dem Spender aufgrund des Transportes zunächst für einige Stunden gelagert werden, bis es dem Empfänger eingesetzt werden kann. Um den Gewebeschaden in dieser Zeit möglichst gering zu halten, wird das Organ direkt vor der Ischämie mit einer 4°C kalten Konservierungslösung gespült und anschließend während des Transportes darin aufbewahrt. So wird eine Hypothermie im Organ verursacht, welche den Metabolismus und den Sauerstoffverbrauch des Organs senkt **[107]** und somit den IRI abdämpft.

Die erste dieser Konservierungslösungen war die University of Wisconsin (UW)-Lösung im Jahre 1988 **[42]**. Mittlerweile wurde die UW-Lösung mehrfach modifiziert (z.B. durch Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Antioxidantien) und auch andere Lösungen verwendet wie die Celsior-Lösung und die Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK)-Lösung, wobei klinische Studien keinen Hinweis auf eine bessere Organfunktion oder höheres Patientenüberleben gegenüber der UW-Lösung geben **[37, 90]**.

Diese Lösungen sollen aber neben der Kaltkonservierung in der Ischämiephase auch die intra- und extrazelluläre Azidose verringern (Pufferwirkung), die Volumenregulation der Zellen aufrechterhalten und zur optimalen Energieausnutzung unter anaeroben Bedingungen beitragen (z.B. mit dem Metaboliten Ketoglutarat).

Bei Leberresektionen spielt die Hypothermie als Schutz vor IRI keine Rolle, da in klinischen Studien keine Vorteile für den Patienten zu erkennen waren **[68]**.

### 1.2.2 Maschinenperfusion

Bei der Maschinenperfusion wird die Leber im Gegensatz zur statischen Kaltkonservierung stetig über mehrere Stunden mit einer hypothermen (4-6°C), normothermen (37°C) oder subnormothermen (20-28°C) Lösung (z.B. UW-Maschinenperfusions-Lösung oder kryopräzipitiertes Plasma) perfundiert. Die Entzündung und Kupfferzellaktivierung und damit der hepatische

Gewebeschaden konnten so reduziert und das Überleben verbessert werden **[34, 113]**.

Weitere positive Wirkungen sind, dass die Mikrozirkulation erhalten bleibt, metabolische Abfallprodukte und Toxine abtransportiert werden können und dass eine verlängerte Konservierungszeit keinen größeren Konservierungsschaden bedeutet **[92]**.

Bisher wurde die Maschinenperfusion der Leber nur im Tiermodell getestet, so dass keine Aussagen über den Nutzen in der Humanchirurgie getroffen werden können.

### 1.2.3 Pharmakologische Interventionen

Eine weitere Möglichkeit zur Prävention des IRI sind pharmakologische Interventionen. Da ROS und entzündliche Prozesse eine wichtige Rolle in der Entstehung des IRI spielen, sind Substanzen wie Antioxidantien (z.B. Tocopherol) und Steroide (z.B. Prednisolon) Gegenstand der Forschung **[1, 111, 120]**.

Aber auch andere Substanzen sind vielversprechend, wie etwa Glucose, welche, in hohen Dosen 24h vor der Operation verabreicht, deutlich den ATP-Spiegel steigern und damit die Organfunktion verbessern konnte **[133]**.

Ebenfalls untersucht wurde Ulinastatin und es konnte gezeigt werden, dass dieser Trypsin-Inhibitor die ROS reduzieren kann und somit antiinflammatorisch und antioxidativ vermutlich über Inhibition der High Mobility Group Box I (HMGB I) dem IRI entgegenwirkt **[3, 137]**.

Ein weiterer Angriffspunkt für IRI ist die Akkumulation der Neutrophilen, was z. B. durch Adenosin oder anti-P-Selectin hervorgerufen werden konnte, um den IRI zu vermindern und die Organfunktion zu verbessern **[103, 104]**.

Weitere pharmakologische Interventionen zur Prävention des IRI sind in der **Tabelle 1.1** zusammengefasst.

Eine große Anzahl pharmakologischer Substanzen zeigen zwar einen Einfluss auf die Enzymmarker des Gewebeschadens, allerdings geben sie keinen Hinweis auf einen klinischen Nutzen. Zusätzlich wird die Verwendung vieler Interventionen durch mögliche Nebenwirkungen limitiert oder sie haben einen Effekt in gesunden Lebern, nicht aber Fettlebern **[114]**.



Substanz	Spezies	Art der Ischämie	Dauer der Ischämie	Effekt
Allopurinol [79] (XOD Hemmer)	Maus	Warme Ischämie	30min.	↓oxidativer Stress und XOD-Aktivität
Atorvastatin [82] (Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase Hemmer)	Maus	Warme Ischämie	60-90min.	↓Leberschaden und oxidativer Stress
EGF [15] (Epidermaler Wachstumsfaktor)	Ratte	Warme Ischämie	60min.	↓Leberschaden
Erythropoietin [51] (Glykoprotein-Hormon)	Maus	Kalte Ischämie	90min.	Schutz der Hepatozyten und SEC ↓Leberschaden und Apoptose
Fruktose [75] (Monosaccharid)	Ratte	Kalte Ischämie	24h	Schutz der Hepatozyten und SEC ↓Leberschaden ↑ATP
Retinol [32] (Vitamin A)	Ratte	Warme Ischämie	60min.	↓Leberschaden und Steatose ↑Regeneration
Sevofluran [9] (Inhalations-Anästhetikum)	Mensch	Warme Ischämie	30min.	↓Leberschaden und postoperative Komplikationen
Tauroursodeoxycholat [58] (Gallensäure)	Ratte	Kalte Ischämie	6h	↓Leberschaden und Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor-γ (PPARγ)-Expression

**Tabelle 1.1: Pharmakologische Interventionen zum Schutz vor IRI**

### 1.2.4 Genterapie

Bei der Entstehung des IRI sind nicht nur Signalwege auf molekularer Ebene involviert, sondern auch genetische Veränderungen spielen eine Rolle und sind somit potenzielle therapeutische Ziele.

Ein Ansatzpunkt bietet z.B. Adiponektin, das vor allem in Fettlebern hormonellen Einfluss auf Entzündungen und Fettsucht ausübt und, als small interfering RNA (siRNA) verabreicht, die Leber vor oxidativem Stress und Gewebeschaden schützt [88].

Gegen den massiven Anfall von ROS infolge Ischämie und Reperfusion wurde das Gen für die Superoxiddismutase (SOD) als adenoviraler Transfer getestet und konnte so den IRI abschwächen und den Leberschaden minimieren [33].

Zur Hemmung von Apoptose wurden Caspase 3 und 8 als siRNA und B-Zellen Lymphom-2 (Bcl-2) und Bcl-2-assoziiertes Athanogen-1 (Bag-1) als Überexpression im Adenovirus getestet. Alle konnten die Apoptose senken und Bag-1 zusätzlich auch TNFα und die mikrozirkulatorischen Störungen reduzieren [20, 117].

Die Neutrophilenakkumulation und –aktivierung konnte durch Reduktion der Expression des ICAM 1 unter Nutzung von Liposomen eingedämmt werden [123].

Weitere Ansätze zur Gentherapie zum Schutz der Leber vor IRI sind in der **Tabelle 1.2** dargestellt.

Jedoch zeigen die experimentellen Daten zur Gentherapie eine Vielzahl an Problemen wie Vektor-Toxizität und die gleichzeitig steigende effiziente Transfektion und Proteinexpression [121], denn Transplantationen sind in der Regel sehr dringend und lassen kaum Zeit für eine Vorbehandlung des Spenders.

Zielgen	Spezies	Art der Ischämie	Dauer der Ischämie	Effekt
FGL2 [116] (Fibrinogen-ähnlich 2)	Maus	Warme Ischämie	60min.	Schutz der Hepatozyten und SEC ↓ Leberschaden
HO-1 [19] (Hämoxygenase-1)	Ratte	Kalte Ischämie	4h	↓ Makrophagen-Infiltration und Apoptose
IL 13 [64] (Interleukin 13)	Ratte	Kalte Ischämie	24h	↓ Zytokin-Freisetzung und Neutrophilen-Akkumulation
NF-κB [146] (Nukleärer Faktor-κB)	Ratte	Warme Ischämie	60min.	↓ Leberschaden, NF-κB, IL-6 und TNFα
TLR4 [52] (Toll-ähnlicher Rezeptor 4)	Maus	Warme Ischämie	60min.	↓ Leberschaden, Zytokin-Freisetzung und Neutrophilen-Infiltration

**Tabelle 1.2: Gentherapien zum Schutz vor IRI**

### 1.2.5 Direkte ischämische Präkonditionierung

Eine mögliche chirurgische Strategie zum Schutz der Leber vor IRI ist die direkte ischämische Präkonditionierung (IPC). Dabei handelt es sich um kurze Perioden von Ischämien gefolgt von Reperfusionen als Vorbereitung des Organs auf eine länger andauernde Ischämie [93]. Sowohl in experimentellen Untersuchungen am Tiermodell als auch in klinischen Studien konnte ein protektiver Effekt auf die Leber nach Ischämie-Reperfusion mit geringeren postoperativen Komplikationen gezeigt werden [18, 28, 49].

Andere Untersuchungen dagegen konnten lediglich sinkende Enzymmarker, allerdings keinen nennenswerten Vorteil durch IPC für die Patienten nach einer Leberresektion feststellen [43].

Es wurden bereits mehrere Mechanismen für die IPC beschrieben, wie z.B. die Rolle von Adenosin und NO [72] sowie der Einfluss auf die Aktivierung von KC und die Freisetzung von Zytokinen und ROS [7].

IPC scheint also experimentell betrachtet in den Ablauf des IRI einzugreifen, jedoch sind diese Effekte nur geringfügig in die klinische Situation übertragbar, auch weil eine Vorbehandlung des Spenders eines Organes zeitlich nicht immer möglich ist.

### **1.2.6 Indirekte ischämische Präkonditionierung**

Eine Varianz der IPC und damit eine weitere chirurgische Methode zur Reduzierung des IRI in der Leber ist die indirekte ischämische Präkonditionierung (RIPC, remote ischemic preconditioning).

Das bedeutet, dass kurze Perioden von Ischämie und Reperfusion in einem Organ bzw. Gefäßbett ein entferntes Gefäßbett und das zugehörige Organ vor IRI schützen können [132].

Die protektiven Mechanismen sind vermutlich wie bei IPC auf Adenosin und NO zurückzuführen, aber auch die Hämoxxygenase-1 (HO-1) und ROS wurden als Ansatzpunkt für RIPC beschrieben [47, 134].

Aus Mangel an Daten aus klinischen Studien findet die RIPC bisher keine Anwendung in der Humanmedizin.

## 1.3 Ischämische Postkonditionierung

### 1.3.1 Entwicklung

Eine weitere chirurgische Maßnahme zum Schutz der Organe vor IRI ist die ischämische Postkonditionierung (IPostC). Dabei handelt es sich wie bei IPC und RIPC um kurze Perioden von Ischämie und Reperfusion im Wechsel, jedoch findet die IPostC erst nach der Ischämiephase (bei Transplantationen also im Organempfänger) und direkt vor der kontinuierlichen Reperfusion statt.

Dieses Prinzip wurde zum ersten Mal 2002 auf einem internationalen Workshop zum Thema Schutz des Herzens des Hatter-Institutes in Cliveden, Berkshire, UK von Vinten Johansen et al. vorgestellt [8]. Dementsprechend wurden die ersten experimentellen Untersuchungen auch an isoliert perfundierten Herzen [139] und *in vitro* und *in vivo* Modellen verschiedener Spezies [69, 126, 159] durchgeführt und zeigten einen protektiven Effekt auf das Myokard.

Die mittlerweile durchgeführten humanen Studien am Herzen geben ein gegensätzliches Bild wieder. Einige lassen darauf schließen, dass IPostC auch einfach und wirkungsvoll in den klinischen Alltag übertragen werden kann [124, 157], andere wiederum konnten keinen nennenswerten Nutzen für den Patienten ermitteln [35, 44].

Nach und nach wurde die IPostC auch auf andere Organe, die einem IRI ausgesetzt sein können, übertragen.

Im Gehirn von Ratten konnte mit verschiedenen Zyklen der IPostC der Verlust an Neuronen und die Freisetzung von Cytochrom c [143] sowie die Caspase-3-Aktivität [148] nach 10min. zerebraler Ischämie gesenkt und der neuronale Schaden minimiert werden. Es existieren bisher keine humanen Studien zur IPostC am Gehirn.

In der Niere konnte mithilfe der IPostC das Kreatinin im Serum gesenkt und die Organfunktion verbessert werden [130], vermutlich durch einen Anstieg der NO-Freisetzung und NO-Synthase-Expression [81] sowie die Erhaltung von antioxidativen Enzymen wie SOD oder Katalase [153]. Die bisher einzige klinische Studie zur IPostC bei Nierentransplantationen konnte jedoch keinen protektiven Effekt bestätigen [140].

Auch die Lunge wurde in experimentellen Studien mit IPostC behandelt. Dadurch konnte das Feucht-/Trockengewicht durch Reduktion der HO-1-Expression **[147]** und der pulmonale Permeabilitätsindex **[80]** gesenkt werden.

Die erste Studie zur Wirkung von IPostC auf die Leber wurde 2004 durchgeführt und zeigte eine Reduktion der hepatozellulären Apoptose durch die Herabregulierung von Bcl-2 sowie die Hemmung von freien ROS **[127]**. In einem Rattenmodell zur Lebertransplantation konnte gezeigt werden, dass die Zytokinlevel nach IPostC niedriger waren bzw. TNF $\alpha$  geringer exprimiert wurde **[145]**. Auch ein positiver Einfluss auf die Leberregeneration konnte bereits nachgewiesen werden **[152]**. Eine experimentelle Studie von 2013 zeigt zusätzlich einen deutlichen Einfluss von IPostC auf die Genexpressionsprofile in der Leber **[70]**.

Für Lunge und Leber wurden bisher keine humanen Untersuchungen durchgeführt, so dass keine Aussage über einen klinischen Nutzen der IPostC an diesen Organen getroffen werden kann.

Wie bei der IPC wurde auch für die IPostC die Variation der indirekten ischämischen Postkonditionierung (RIPostC, remote ischemic postconditioning) getestet. Die erste experimentelle Studie dazu wurde 2005 am Herzen durchgeführt und die Infarktgröße konnte um fast 50% reduziert werden **[65]**. Klinisch wurde die RIPostC dann erstmals 2006 am endothelialen IRI getestet und konnte nach 20min. Ischämie die flussvermittelte Gefäßerweiterung erhalten und somit die Durchblutung verbessern **[83]**. Weitere Studien zeigten ebenfalls eine Minderung des kardialen Schadens durch RIPostC **[24, 160]**.

An der Leber wurde RIPostC experimentell bisher nur am systemischen Entzündungsmodell (Lipopolysaccharid-induziert) getestet, wodurch die Immunantwort abgeschwächt und das Überleben verbessert werden konnte **[67]**. Die bisher einzige humane Studie zur RIPostC bei Leber-Lebendspenden konnte zwar keinen protektiven Effekt für die Organfunktion feststellen, allerdings wurde durch RIPostC die Häufigkeit des akuten Nierenversagens nach den Lebertransplantationen reduziert **[66]**.

### 1.3.2 Algorithmen

Neben Alter, Geschlecht und Spezies kann auch die IPostC selbst in der Dauer und Anzahl der Wiederverschlüsse der Gefäße und in der Dauer der dazwischenliegenden Reperfusionen variieren.

Eine vergleichende Studie zu IPostC-Protokollen am Herzen von Skyschally et al. beschreibt, dass der protektive Effekt in erster Linie von der Dauer der einzelnen Perioden Ischämie/Reperfusion im Zusammenspiel mit der Anzahl abhängt. Zum Beispiel musste in einem in vivo-Kaninchen-Modell die Dauer der Zyklen von 10sec. auf 20sec. erhöht werden, um eine kardioprotektive Wirkung zu erzielen [16]. Aber auch zu lange Zyklen können den Erfolg der IPostC außer Kraft setzen, da so der Ischämieanteil der IPostC im Verhältnis zur eigentlichen Ischämiephase zu groß wird [119]. Allerdings ergibt sich bei gleicher Anzahl der Zyklen, aber unterschiedlicher Dauer des einzelnen Zyklus, auch eine längere Gesamtdauer der IPostC, so dass auch dieser Aspekt in Bezug auf das zuvor erwähnte Kaninchenmodell beachtet werden muss [53].

Das Intervall zwischen Ischämiephase und Beginn der IPostC hat ebenfalls Einfluss auf eine erfolgreiche Protektion des Organs, was möglicherweise auf eine mangelnde Aktivierung von Adenosinrezeptoren zurückzuführen ist [25].

Zusätzlich wurde in Bezug auf den myokardialen Infarkt die Ischämiephase (vor IPostC und Reperfusion) als limitierender Faktor beschrieben. Wenn sie zu lang ist, ist der Infarkt bereits so weit fortgeschritten, dass keine Chance mehr auf Rettung besteht [119]. Ist sie jedoch zu kurz ist, ist der Schaden so gering, dass auch nur geringfügig Gewebe geschützt werden kann, so dass kein nennenswerter Effekt entsteht [119].

Die Wahl des Algorithmus kann also einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkung der IPostC und den Nutzen für das durch IRI geschädigte Organ haben.

### 1.3.3 Molekulare Mechanismen

#### 1.3.3.1 Überblick

Da die IPostC zuerst am Herzen entwickelt und experimentell und klinisch untersucht wurde, sind auch die möglichen Mechanismen der IPostC zum Großteil in Bezug auf das Herz beschrieben. Allerdings geben die vorhandenen Daten zur Leber dieselben Ansätze für mögliche Mechanismen an. Daher werden in der nachfolgenden Arbeit alle bisher bekannten molekularen Aspekte der IPostC zusammengefasst dargestellt. Da diese Intervention erst nach der Ischämie stattfindet, kann sie nur in den Verlauf der Reperfusion eingreifen und nutzt vermutlich die frühe Phase der Reperfusion als therapeutisches Ziel **[115]**.

Der protektive Effekt von IPostC kann grob in drei Schritte eingeteilt werden. Zunächst werden sogenannte *Trigger* (z. B. Adenosin, Opiode oder ROS) extrazellulär akkumuliert und binden an Rezeptoren auf den Zelloberflächen. Daraufhin werden Kinase-Signalwege (z.B. Proteinkinase G oder Proteinkinase C) aktiviert, die als *Mediatoren* schließlich zur Aktivierung oder Hemmung der *Endeffektoren* (z.B. mPTPs) führen **[96]** (**Bild 1.2**).

#### 1.3.3.2 Trigger

Ein häufig genannter und wichtiger Trigger ist Adenosin, welches ein Abbauprodukt des ATP ist und seine Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPGR) vermittelt. Da diese Rezeptoren in myokardialen und vaskulären Zellen zu finden sind, werden sie vermutlich infolge der Akkumulierung des Adenosins durch IPostC stimuliert. Die protektive Wirkung am Herzen wird daraufhin wahrscheinlich über die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), der Proteinkinase C (PKC) und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und schließlich auf mitochondrialer Ebene umgesetzt **[100]**. Außerdem wurde beschrieben, dass Adenosin die Freisetzung von Oxidantien und Zytokinen aus dem koronaren Gefäßendothel und den Myozyten abschwächt **[141]**.

Auch Bradykinin wird eine mögliche Rolle bei der Vermittlung des protektiven Effekts durch IPostC zugeschrieben. Es handelt sich dabei um ein Peptid- und Gewebshormon, dass unter anderem für das Endothel als Vasodilatator und für

nicht-vaskuläre glatte Muskulatur als Vasokonstriktor fungiert und zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität beiträgt [27]. Mithilfe eines selektiven Bradykinin-B2-Rezeptor-Antagonisten (HOE140 und WIN64338) wurde die IPostC-induzierte Minderung des Zellschadens am Herzen aufgehoben und somit die Bedeutung von Bradykinin verdeutlicht [101].

Ebenfalls als Trigger für die IPostC beschrieben sind endogene Opiode, die über den  $\kappa$ -Opioid-Rezeptor (GPGR) vermutlich zur Aktivierung der PKC und anschließend zur Öffnung von mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanälen ( $mK_{ATP}$ ) führten [142].

Opiode haben morphinartige Eigenschaften und spielen eine wichtige Rolle bei der Schmerzunterdrückung im Verlauf von Stressreaktionen [6].

Die Hemmung des  $\kappa$ -Opioid-Rezeptors mit Norbinaltorphimin (selektiver  $\kappa$ -Opioid-Rezeptor-Antagonist) konnte die kardioprotektive Wirkung von IPostC aufheben und bestätigte damit die Beteiligung von Opioiden am Pathomechanismus von IPostC [142].

Eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Funktionen des Endothels spielt NO. Es wurde, vermutlich durch Verhinderung der Akkumulation von Neutrophilen, ein protektiver Effekt während der Reperfusion auf ischämisches Myokard [59] und auch auf Leber-Transplantate sowie nach warmer Ischämie beobachtet [41, 145]. Diese Wirkung kann über den NO-zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)-Signalweg ausgelöst werden, aber auch eine Stimulation der Proteinkinase G (PKG) mit anschließender Aktivierung von  $mK_{ATP}$ s und Hemmung der mPTPs wurde am Herzen beschrieben [150].

Eine weitere Gruppe von Triggern stellen proinflammatorische Zytokine dar. Deren Freisetzung konnte durch IPostC eingedämmt werden, vermutlich infolge der Reduktion der Neutrophilenakkumulation und Aktivierung des Endothels [48, 69]. Zusätzlich können Zytokine wie  $TNF\alpha$ , IL 1 und IL 6 über den  $TNF\alpha$ -Rezeptor die Janus-Kinase (JAK) aktivieren und so den Zelltod durch Apoptose reduzieren [97].

ROS haben aufgrund der Oxidation von Lipidperoxiden in Zellmembranen, Proteindenaturierung und Strangbrüche der genomischen DNA einen großen Anteil an der Entstehung des IRI und stellen deshalb einen potentiellen Trigger für IPostC dar [63].



Es konnte sowohl an Herzmuskelzellen als auch an in vivo Modellen des Herzens und der Leber eine Reduktion der ROS durch IPostC erreicht werden [41, 45, 126], was darauf hinweist, dass sie in die protektiven Mechanismen involviert sind.

An der Leber wurde als möglicher Mechanismus für die Reduktion der ROS infolge IPostC eine verminderte Akkumulation von Neutrophilen und somit die Hemmung einer der wichtigsten Quellen für oxidativen Stress beschrieben [145].

### 1.3.3.3 Mediatoren

Einer der Mediatoren im Mechanismus der IPostC scheint der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase-B-Signalweg (PI3K/PKB-Signalweg; auch PI3K/Akt-Signalweg) zu sein. Dies ist ein intrazellulärer Signalweg zur Regulierung von Zellwachstum, Zellzyklus und Stoffwechsel. Nach Aktivierung der PI3K durch extrazelluläre Signale phosphoryliert diese Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) und PIP<sub>3</sub> bindet PKB und lokalisiert es in der Zellmembran [12]. Dort wird die PKB durch weitere Kinasen phosphoryliert und aktiviert und kann dann eine Reihe von Substraten wie die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) oder Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death (BAD) aktivieren oder inhibieren, die auf verschiedene Weise in den Stoffwechsel der Zelle eingreifen [12].

Die Rolle von PI3K wurde durch die PI3K-Antagonisten LY294002 und Wortmannin, welche die schützende Wirkung von IPostC am Herzen außer Kraft setzten, bestätigt [139]. Den gleichen Effekt zeigten auch Untersuchungen an der Leber [162] und am Gehirn [108]. Es wurde außerdem beschrieben, dass PI3K die mPTPs des Herzens reguliert und so dem IRI entgegenwirkt [10].

Neben der PKB gibt es weitere cGMP-abhängige Serin/Threonin-Proteinkinasen, die beim protektiven Mechanismus der IPostC eine Rolle spielen, die PKG und die PKC. Beide können verschiedene Substrate durch Phosphorylierung regulieren, wobei PKG hauptsächlich Einfluss auf die Thrombozytenfunktion, die Zellteilung und die Nukleinsäure-Synthese nimmt und die PKC das zelluläre Wachstum sowie Zellteilung und Proliferation kontrolliert [73].

Vom Einfluss der PKG auf mK<sub>ATPs</sub> bei IPostC am Herzen wurde berichtet, indem mit einem PKG-Inhibitor IPostC außer Kraft gesetzt wurde [22, 46].

Die PKC wird durch Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Phospholipide und Diacylglycerin (DAG) aktiviert und ist mit den Isoformen PKC $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$ , - $\epsilon$  und - $\zeta$  in allen Zelltypen nachweisbar [73]. Chelerythrin als nicht-selektiver Antagonist und KIE1-1 als selektiver Antagonist für PKC $\epsilon$  konnten die Kinasen am Herzen blocken und damit den Effekt der IPostC aufheben [154].

Ebenfalls als Mediatoren dienen die MAPKs, welche unter anderem für die Zelldifferenzierung und den programmierten Zelltod (Apoptose) verantwortlich sind [73]. Nach Aktivierung durch z.B. Adenosin oder Zytokine (TNF $\alpha$ , IL 1) können sie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, die daraufhin in den Zellkern gelangen und so die Transkription zahlreicher Zielgene in die Wege leiten [99]. Den protektiven Effekt der IPostC unterstützen die MAPKs, neben anderen Organen, an der Leber durch eine Reduzierung der Apoptose während der Reperfusion, indem sie proapoptotische Proteine (wie z.B. Bax und BAD) runterregulieren und antiapoptotische Proteine (wie z.B. Bcl-2 und Bcl-XL) vermehrt exprimieren [97, 128]. Ein Mediator für Zytokine ist die Tyrosinkinase JAK. Im aktivierten Zustand phosphoryliert sie Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT-Proteine), die nach Migration in den Zellkern als Transkriptionsfaktoren spezifischer Zielgene fungieren und im Rahmen der IPostC wie die MAPKs den programmierten Zelltod beeinflussen [50, 97]. Für die Leber wurde die Rolle der STAT3-Proteine im Zusammenspiel mit TNF $\alpha$  und IL 6 ebenfalls als Signalweg im Rahmen der verbesserten Leberregeneration durch IPostC beschrieben [149].

#### 1.3.3.4 Endeffektoren

Die Öffnung der mPTPs wurde in den ersten Minuten der Reperfusion am Herzen beobachtet [95] und fällt somit auch in das therapeutische Fenster der IPostC. Diese spannungsabhängigen Poren befinden sich in der inneren mitochondrialen Membran, öffnen sich infolge erhöhten oxidativen Stresses und Kalzium-Überschusses und tragen durch die Auslösung von Apoptose einen großen Teil zur Fortsetzung des IRI mit dem Einsetzen der Reperfusion bei [110].

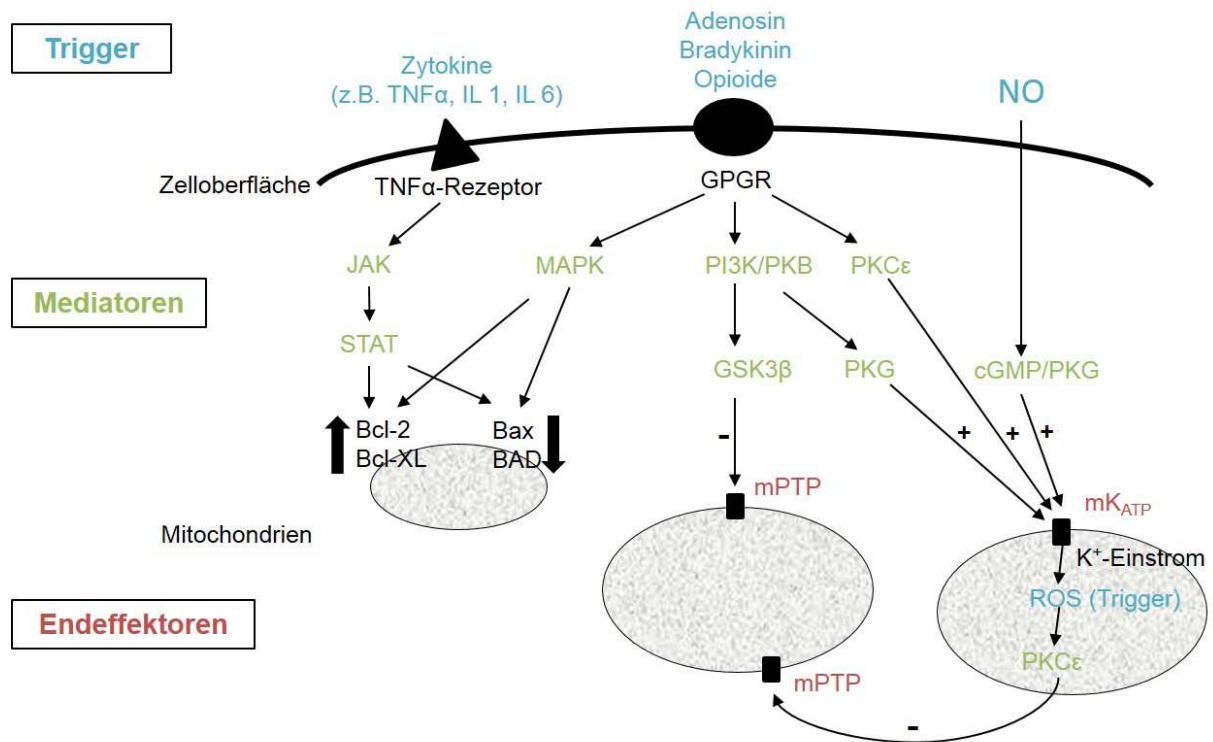
Die Hemmung der mPTPs mit NIM811 konnte den Zelltod am Herzen und in der Leber reduzieren [5, 77] und deutet somit auf einen möglichen Endeffektor der IPostC hin. Dieselbe Studie konnte außerdem zeigen, dass ein Kalzium-induziertes Öffnen der mPTPs durch IPostC gehemmt werden konnte [5].

Auch NO kann über die Aktivierung der PKG eine inhibierende Wirkung auf die kardialen mPTPs infolge einer IPostC haben [150].

Für den PI3K/PKB-Signalweg wurde über die inhibierende Wirkung der Glykogen-Synthase-Kinase-3beta (GSK3 $\beta$ ) ein Einfluss auf die mPTPs [61] und somit ein möglicher Mechanismus für die IPostC beschrieben.

Als weiterer Endeffektor können mK<sub>ATPS</sub> betrachtet werden. Viele Studien haben im Zusammenhang mit dem kardioprotektiven Effekt der IPostC eine Aktivierung von GPCRs auf der Zelloberfläche mit anschließender Öffnung der mK<sub>ATPS</sub> gezeigt [13, 29, 101]. Die Hemmung der mK<sub>ATPS</sub> von Neuronen mit Glibenclamid (nicht-selektiver Antagonist für ATP-abhängige Kalium-Kanäle) konnte die schützende Wirkung durch IPostC aufheben und so die Rolle von neuronalen mK<sub>ATPS</sub> in diesem Mechanismus bestätigen [109].

Die Öffnung der mK<sub>ATPS</sub> wird über eine Phosphorylierung durch die PKC vermittelt, die wiederum zuvor z.B. durch Adenosin aktiviert wurde [91]. Weitere Studien zum Herzen konnten die Isoform PKC $\epsilon$  als verantwortliche Kinase für die Aktivierung der ATP-abhängigen Kanäle herausfiltern und bestätigen [21, 118]. Infolge der Phosphorylierung durch PKC $\epsilon$  wird die Untereinheit Kir6.2 der mK<sub>ATPS</sub> aktiviert und formt Poren in der Membran der kardialen Mitochondrien [38]. So kann ein Einstrom von Kalium in die Mitochondrien erfolgen. Das Matrixvolumen und der pH-Wert steigen und tragen zur vermehrten Produktion von ROS im Herzen bei [23]. Die ROS phosphorylieren und aktivieren die mitochondriale PKC $\epsilon$ , welche die mPTPs inhibiert und so den kardialen Zelltod vermindert [39].



**Bild 1.2: Molekulare (bisher bekannte) Mechanismen der IPostC**

**cGMP:** zyklisches Guanosinmonophosphat; **GPGR:** G-Protein-gekoppelter-Rezeptor; **GSK3 $\beta$ :** Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$ ; **IL 1:** Interleukin 1; **IL 6:** Interleukin 6; **JAK:** Januskinase; **MAPK:** Mitogen-aktivierte Proteinkinase; **mK<sub>ATP</sub>:** mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal; **mPTP:** Mitochondrien-Permeabilitäts-Transitions-Poren; **NO:** Stickstoffmonoxid; **PI3K:** Phosphatidylinositol-3-Kinase; **PKB:** Proteinkinase B; **PKC $\epsilon$ :** Proteinkinase  $\epsilon$ ; **PKG:** Proteinkinase G; **STAT:** Signal Transducers and Activators of Transcription; **TNF $\alpha$ :** Tumornekrosefaktor  $\alpha$ .

## 2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Ausgehend von den bereits bekannten und zuvor vorgestellten Daten, erscheint die IPostC als eine vielversprechende Methode zum Schutz der Leber vor IRI sowohl bei Teilresektionen als auch bei Transplantationen. Sie ist schnell, praktisch und kostengünstig. Der Vorteil gegenüber vielen pharmakologischen Interventionen und IPC ist vor allem in Bezug auf Lebertransplantationen, dass keine Vorbehandlung des Organspenders nötig ist, denn diese stellt sowohl organisatorisch als auch zeitlich ein gravierendes Problem dar.

Die protektive Wirkung von IPostC wurde mehrfach experimentell an gesunden Tiermodellen demonstriert **[70, 127, 145, 152]**. Zu anderen Lebermodellen wie Fettleber, Fibrose oder Zirrhose existieren bisher keine Daten. Dabei ist besonders die Prävention von verfetteten Lebern vor IRI, welche häufig aus Mangel an verfügbaren Organen für Transplantationen verwendet werden müssen, ein relevantes Thema. Aber auch fibrotische und zirrhotische Lebern müssen nach Resektionen vor einem zusätzlichen Schaden bewahrt werden, da das Organ durch die zugrundeliegende und für die Fibrose oder Zirrhose verantwortliche Erkrankung bereits enorm vorbelastet und die Organfunktion stark eingeschränkt ist.

Es gilt also zu klären, ob nicht nur gesunde, sondern auch verfettete, fibrotische und zirrhotische Lebern mithilfe von IPostC nach Transplantationen bzw. Teilresektionen vor IRI geschützt werden können. Zusätzlich sollen bereits bekannte molekulare Mechanismen der IPostC bestätigt und neue entdeckt werden, möglicherweise mit unterschiedlicher Ausprägung zwischen den verschiedenen Lebermodellen.

Um einen Einfluss des Algorithmus der IPostC zu berücksichtigen, haben wir zwei verschiedene Zyklen gewählt. Mit vielen kurzen Zyklen (8x20sec.) können wir durch ein frühes Eingreifen in die Prozesse der Reperfusion einen stärkeren Effekt erzielen. Falls dieses Zeitfenster jedoch zu kurz ist, kann der zweite Zyklus mit weniger und längeren Zyklen (4x60sec.) greifen. Dieser bringt den Vorteil mit sich, dass die Gefäße seltener abgeklemmt werden müssen, was noch einfacher in der Praxis umzusetzen ist und den Gewebestress reduziert.

Das Ziel für potentielle sich anschließende klinische Situationen ist es, eine weitere Möglichkeit zu bieten, um vermehrt marginale Organe mit guten Prognosen für Lebertransplantationen einsetzen zu können und so den Organpool zu erweitern. Des Weiteren soll das Resultat für fibrotische und zirrhotische Lebern nach Resektionen verbessert werden, so dass der zusätzliche Gewebeschaden möglichst gering ausfällt und die Organfunktion nicht zusätzlich eingeschränkt wird.

Zusammengefasst sollen folgende Punkte in der vorliegenden Arbeit untersucht und diskutiert werden:

- 1. Sprechen marginale Lebern nach Ischämie und Reperfusion ebenso auf IPostC an wie gesunde Lebern?**
- 2. Welche Mechanismen vermitteln den möglichen protektiven Effekt der IPostC?**
- 3. Wirkt sich der Algorithmus der IPostC auf den protektiven Effekt aus?**

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Isolierte Rattenleberperfusion *in situ*

##### 3.1.1 Tiere

Es wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 151-175g von Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld) bezogen. Diese wurden in einem temperatur- und feuchtigkeitsregulierten Raum mit konstantem 12h Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (ssniff® R/M-H Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Die Verwendung und Haltung der Tiere wurde von der Regierung Oberbayern genehmigt und überwacht.

##### 3.1.2 Reagenzien

Krebs-Henseleit-Medium (KH-Medium) pH 7,4:

NaCl (MW: 58,44)	138 g/l
KCl (MW: 74,56)	7,16 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MW: 136,09)	3,27 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (MW: 246,48)	5,92 g/l
NaHCO <sub>3</sub> (MW: 84,01)	42,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> (MW: 147,02)	4,41 g/l

##### 3.1.3 Durchführung

Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion Narcoren® (Merial GmbH, Hallbergmoos, 50mg/kg KG) anästhesiert und erhielten außerdem intravenös Heparin (ratiopharm GmbH, Ulm, 2000-5000U/kg KG) über die *Vena (V.) femoralis*. Nach einer medianen Laparotomie wurden die Leber und das Portalsystem dargestellt. Eine Ligatur wurde um die abdominale *V. cava caudalis* oberhalb der renalen Arterie und zwei Ligaturen wurden im Abstand von ca. 1cm um die Portalvene gelegt. Im Anschluss wurde ein Katheter, welcher mit den zuvor gelegten Ligaturen fixiert wurde, in die Portalvene eingeführt und die Leber mit einem

bicarbonat-gepufferten KH-Medium (37°C; begast mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, Linde, Unterschleißheim) perfundiert. Der Abfluss des Perfusates erfolgte über einen Schnitt in die *V. cava caudalis*. Nun wurde der Thorax geöffnet und zwei Ligaturen um die thorakale *V. cava caudalis* gelegt. In das rechte Atrium wurde ein Katheter eingeführt und mit den Ligaturen gesichert. Nach dem Schluss der Ligatur um die abdominale *V. cava caudalis* wurde das Medium durch das rechte Atrium abgeleitet und konnte so für spätere Messungen aufgefangen werden.

Abschließend wurde zur Bestimmung des Galleflusses während der Perfusion der *Ductus choledochus* kanüliert (mit Ausnahme der zuvor Gallengangs-legierten Tiere wie unter 3.2.2 beschrieben). Die Galle konnte so über die gesamte Zeit der Perfusion gesammelt und anschließend gewogen werden, um die Menge (in µl) pro Minute x Gramm Leber berechnen zu können.

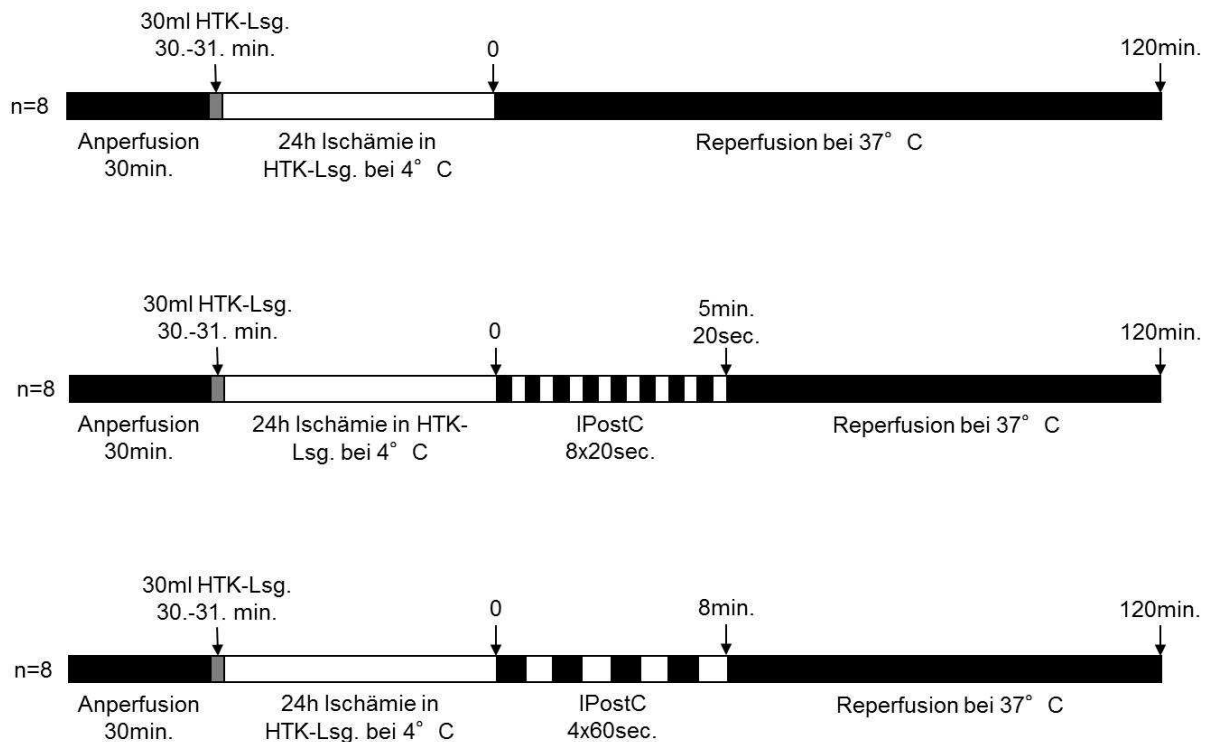
Der portale Perfusionsdruck wurde über die gesamte Zeit der Perfusion über eine Wassersäule dargestellt und dokumentiert (in cmH<sub>2</sub>O).

Das Perfusat und die Galle wurden zu definierten Zeitpunkten abgenommen und zusammen mit Leberproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C (HERAFreeze Top, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) gelagert. Weitere Proben der Lebern wurden für histologische Auswertungen in Formalin (Microcos GmbH, Garching) fixiert und bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.1.4 Kalte Ischämie ± IPostC

Für das Modell der Lebertransplantation wurde eine kalte Ischämie durchgeführt. Es erfolgte zunächst eine 30-minütige Anperfusion der Leber und anschließend eine Durchspülung mit 30ml kalter HTK-Lösung nach Bretschneider (Custodiol, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim). Die Leber wurde für 24h bei 4°C in HTK-Lösung gelagert, gefolgt von einer 2-stündigen Reperfusion mit KH-Medium bei 37°C. Für die Kontrollgruppe erfolgte nur die Reperfusion, für die Interventionsgruppen wurde im Anschluss an die 24-stündige Ischämie IPostC in zwei verschiedenen Zyklen durchgeführt: 8x20sec. und 4x60sec. (**Bild 3.1**). Die kalte Ischämie erfolgte an den Lebermodellen gesund und Fettleber. Sowohl für die Kontrollgruppe als auch für beide Interventionen wurden 8 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

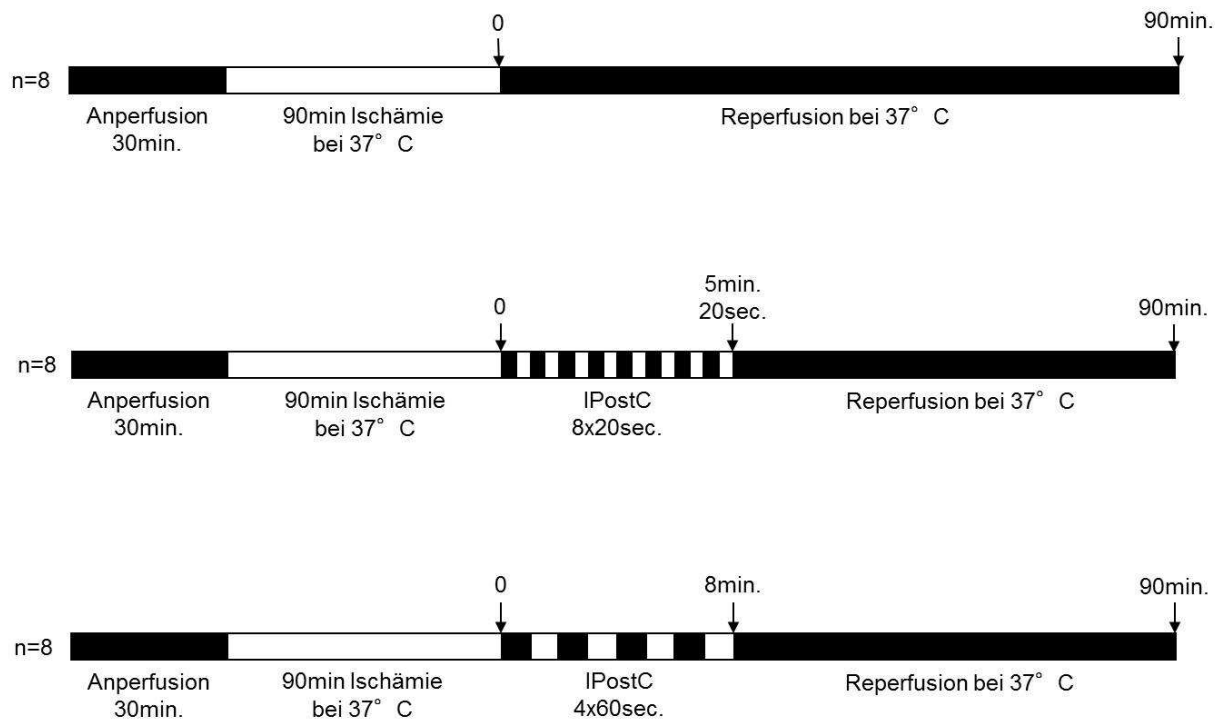




**Bild 3.1: Versuchsschema kalte Ischämie ± IPostC**

### 3.1.5 Warme Ischämie ± IPostC

Zur Umsetzung einer Teilresektion der Leber wurde eine warme Ischämie durchgeführt. Dafür wurde die Leber 30min. anperfundiert und anschließend 90min. bei 37°C gelagert. Dabei wurde sie mit 0,9% NaCl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)-befeuchteter Gaze abgedeckt und die Temperatur mittels Thermometer überwacht. Nach der Ischämie erfolgte eine 90-minütige Reperfusion. Wie bei der kalten Ischämie, wurden die beiden Interventionen der IPostC mit 8x20sec. und 4x60sec. im Anschluss an die warme Ischämie mit 8 voneinander unabhängigen Experimenten pro Versuchsgruppe durchgeführt (**Bild 3.2**). Die warme Ischämie erfolgte an den Lebermodellen gesund, Leberfibrose und Leberzirrhose.

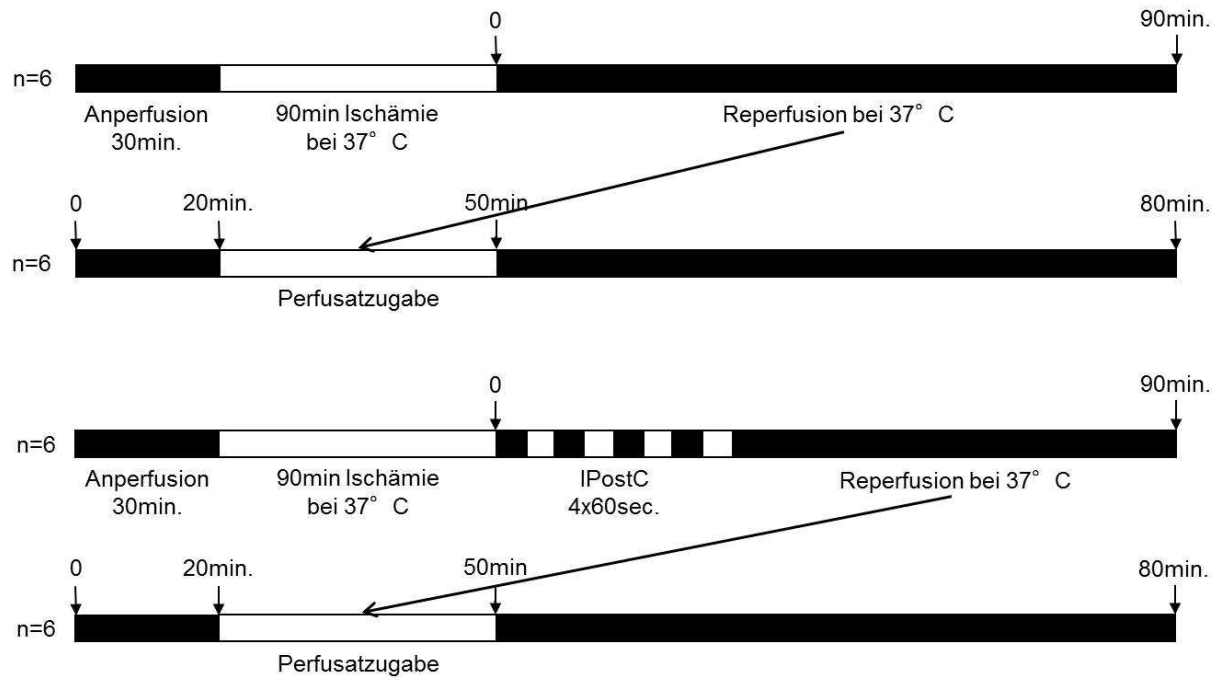


**Bild 3.2: Versuchsschema warme Ischämie  $\pm$  IPostC**

### 3.1.6 „Folgeperfusionen“ nach warmer Ischämie $\pm$ IPostC 4x60sec.

Zur genaueren Untersuchung des Mechanismus hinter der IPostC wurden sogenannte „Folgeperfusionen“ durchgeführt. Dazu wurde, wie schon zuvor beschrieben, eine gesunde Leber 90min. der warmen Ischämie ausgesetzt und anschließend mit und ohne IPostC mit 4x60sec. reperfundiert. Das Perfusat der gesamten Reperfusion wurde gesammelt.

Dieses Perfusat aus dem Ischämieversuch wurde nun in eine zweite Perfusion einer gesunden Leber eingebracht. Diese wurde zunächst 20min. mit KH-Medium perfundiert, dann für 30min. mit dem gesammelten Perfusat und anschließend für weitere 30min. erneut mit KH-Medium (**Bild 3.3**). Pro Versuchsgruppe wurden 6 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.



**Bild 3.3: Versuchsschema „Folgeperfusionen“ nach warmer Ischämie ± IPostC**

## 3.2 Lebermodelle für die isolierte Rattenleberperfusion

### 3.2.1 Fettleber

Zur Induktion einer Fettleber [76, 112, 131] erhielten die Tiere zunächst für 10 Tage eine Kontrolldiät mit 10% Energie aus Fett (Spezialfuttermittel C 1090-10 Kontrolldiät zu Obesitas-induzierender Diät [DIO-Diät], Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage), um den Magen-Darm-Trakt auf eine High fat diet (HFD) vorzubereiten. Im Anschluss wurde ihnen über 4 Wochen eine HFD mit 70% Energie aus Fett (Spezialfuttermittel C 1090-70 DIO-Diät, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) verabreicht. Dann erfolgten die Perfusionen, wie unter 3.1.4, 3.1.5 und 3.1.6 beschrieben.

### 3.2.2 Leberfibrose

Infolge einer 4-wöchigen Gallengangsligatur (bile duct ligation, BDL) entwickelten die Tiere eine Leberfibrose. Dazu wurden sie mit einer intraperitonealen Injektion Narcoren® (1:3 verdünnt mit 0,9% NaCl; 50mg/kg KG) anästhesiert und erhielten zusätzlich eine subkutane Injektion Temgesic® (Reckitt Benckiser Healthcare Ltd., Slough, 0,05mg/kg KG) 24h vor der OP, zur Anästhesie und die nächsten 5 Tage post op 2x täglich. Die Bauchdecke wurde rasiert und mit Braunol® (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) desinfiziert. Nach medianer Laparotomie entlang der Linea alba wurde die Leber zur Darstellung des Portalsystems nach kranial verlagert. Der Ductus choledochus wurde mit einer Pinzette unterfahren, zweimal im Abstand von ca. 1cm mit 3-0 Prolene (ETHICON, LLC., Somerville) legiert und zwischen den Ligaturen durchtrennt. Die Leber wurde in die Ursprungsposition zurückgebracht. Bauchdecke und Haut wurden jeweils mit fortlaufender Naht mit 3-0 Prolene verschlossen. Bis zur Perfusion 4 Wochen später erhielten die Tiere 3x pro Woche oral Konakion® MM (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, 0,4mg/kg KG), um Blutungen vorzubeugen.

### 3.2.3 Leberzirrhose

Eine Leberzirrhose wurde durch eine 18-wöchige Gabe von Thioacetamid (TAA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis) über das Trinkwasser induziert. Dabei wurde nach dem Verfahren von Laleman **[74]** vorgegangen. Die Startdosis betrug 0,03% TAA und die Tiere sollten über die gesamten 18 Wochen ein Gewicht von 200-250g behalten. Sie wurden einmal pro Woche gewogen und die TAA-Dosis wurde bei Gewichtszunahme (+ 20g zur Vorwoche bzw. + 60g zum Anfangsgewicht) um 50% erhöht und bei Gewichtsabnahme (-20g zur Vorwoche bzw. -60g zum Anfangsgewicht) um 50% gesenkt. Das Trinkwasser wurde 3x pro Woche frisch angesetzt.

### 3.3 *In vivo* Modell Ratte

#### 3.3.1 Tiere

Es wurden die gleichen Tiere wie unter 3.1.1 beschrieben verwendet.

#### 3.3.2 Durchführung

Zur Darstellung einer Teilresektion der Leber, wurde die warme Ischämie, neben den Perfusionen, auch in einem *in vivo* Modell durchgeführt.

Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion Narcoren® (1:3 verdünnt mit 0,9% NaCl; 50mg/kg KG) anästhesiert und erhielten zusätzlich eine subkutane Injektion Temgesic (0,05mg/kg KG) zur Analgesie. Die Bauchdecke wurde rasiert und mit Braunol® desinfiziert.

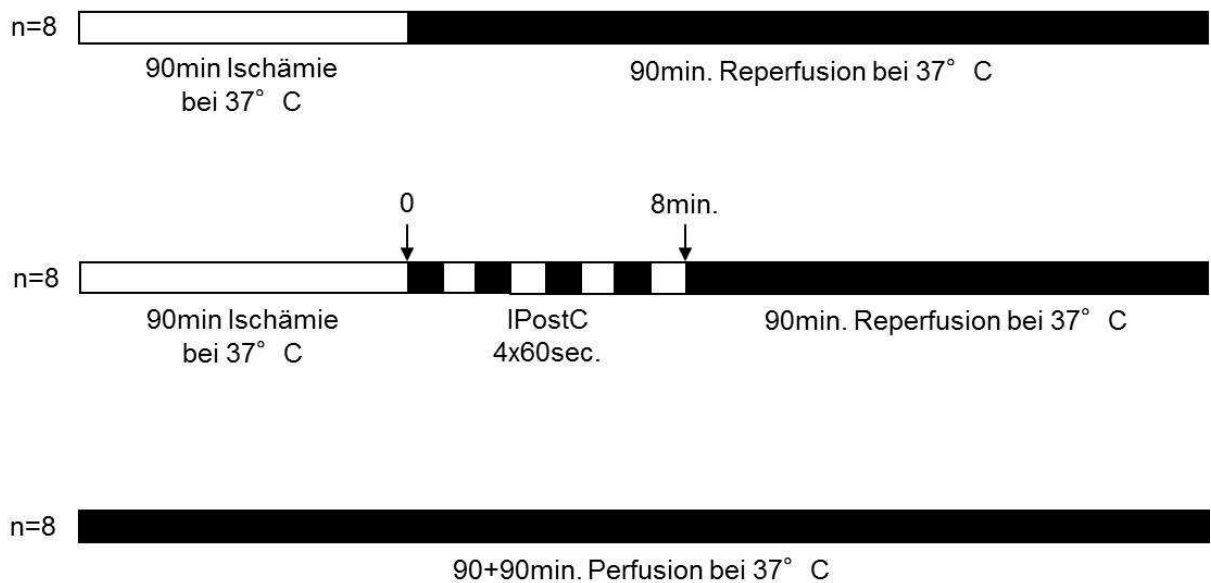
Zunächst wurde die *Arteria* (A.) *carotis* freipräpariert und kranial und kaudal mit Gefäßclips (Aesculap B. Braun Melsungen AG, Melsungen) abgeklemmt. Dann wurde ein Katheter in die A. *carotis* eingeführt und mit zuvor gelegten Ligaturen fixiert. Kranial wurde das Gefäß mittels einer weiteren Ligatur verschlossen. Die Klemmen wurden entfernt und zurückströmendes Blut mithilfe des Perfusors (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) mit 0,9% NaCl aus dem Katheter gespült. Über einen Druckabnehmer (Becton, Dickinson and Company [BD], Franklin Lakes, New Jersey) am Katheter konnte der mittlere arterielle Druck auf einem Monitor (Siemens SC 7000, Siemens-Elema AB, Solna) verfolgt und somit die Narkose überwacht werden.

Die Bauchdecke wurde nun durch eine mediane Laparotomie entlang der *Linea alba* geöffnet, um die Aufzweigung der Portalvene und der A. *hepatica* in die einzelnen Lebersegmente darzustellen. Der linke Leberlappen (Segment VIII) wurde über die V. *portae* und A. *hepatica* mit einem Gefäßclip okkludiert und die Bauchdecke mit 3-0 Prolene verschlossen. Nach 90min. warmer Ischämie wurde der Bauchraum wieder geöffnet und die Klemme entfernt, so dass der linke Leberlappen seine Ursprungsfarbe zurückerhielt. Bei der Kontrollgruppe erfolgte nach der Ischämie eine kontinuierliche Reperfusion, für die Interventionsgruppe wurde IPostC mit 4x60sec. durchgeführt (**Bild 3.4**). Die Bauchdecke wurde erneut verschlossen. Nach 90min. Reperfusion erfolgte eine Blutentnahme über die V. *cava caudalis* sowie die

Entnahme der Leber. Proben des linken Leberlappens wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend zusammen mit dem abzentrifugierten Serum bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Weitere Leberproben wurden in Formalin fixiert.

Zusätzlich wurden sham-Versuche durchgeführt. Dabei wurde lediglich der Bauchraum geöffnet, das Portalsystem dargestellt, die Bauchdecke wieder geschlossen und für 90+90min. perfundiert (**Bild 3.4**).

Für jede Versuchsgruppe wurden 8 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.



**Bild 3.4: Versuchsschema in vivo Modell Ratte**

### 3.4 Histologische Untersuchungen

Die Einbettung der Lebern in Paraffin, die Färbung der Schnitte sowie die histologische Auswertung erfolgte im Pathologischen Institut der Medizinischen Fakultät der LMU München durch Frau Prof. Dr. med. Doris Mayr und Frau Dr. med. Marie-Christine Makeschin.

#### 3.4.1 Paraffin-Einbettung von Gewebe

Die Lebern wurden direkt nach den Versuchen entnommen, in 4% Formalin fixiert und bei RT gelagert.

Nach dem Zuschneiden des Gewebes wurde es mit Wasser gespült und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (bis hin zu 100% Ethanol) entwässert. Danach wurde es mit Xylol getränkt, welches sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin mischbar ist. Dann erfolgte die Einbettung in erwärmtes, flüssiges Paraffin. Nach dem Erkalten und Aushärten des Paraffins, wurden am Mikrotom dünne Schnitte des Gewebes angefertigt und diese auf Objektträger aufgezogen. Zur Beurteilung am Mikroskop erfolgten im Anschluss die Automatenfärbungen der Paraffinschnitte am Sakura Tissue-Tek Prisma (Sakura Finetek USA Inc., Torrance CA).

#### 3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ist eine Standardmethode in der Histologie. Sie ist schnell, gibt einen einfachen Einblick in die Struktur von Geweben und ermöglicht eine Einschätzung von pathologischen Prozessen (wie z.B. Entzündungen oder Degenerationen). Darauf basierend können Spezialfärbungen zur Feintypisierung durchgeführt werden.

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff und färbt in seiner oxidierten Form, dem Hämatein, alle sauren (basophilen) Strukturen blau. Dazu gehören die Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und das raue endoplasmatische Retikulum (rER) mit den Ribosomen.



Eosin ist ein synthetischer Farbstoff und färbt die basischen (azidophilen) Zellbestandteile wie Zellplasmae, das glatte endoplasmatische Retikulum (sER), Mitochondrien und auch Kollagen und Keratin hellrosa bis pink.

#### 3.4.2.1 Reagenzien

96% Ethanol: 4,8l 100% Ethanol in 200ml destilliertem Wasser

70% Ethanol: 3,5l 100% Ethanol in 1,5l destilliertem Wasser

Xylol

Hämatoxylin nach Mayer

Eosin alkoholisch

#### 3.4.2.2 Durchführung

Zunächst erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin nach Mayer, wobei positiv geladene Metall-Hämatoxylin-Komplexe an die negativ geladenen Phosphatreste der Zellkern-DNA binden. Die Zellkerne erschienen nun aufgrund des sauren pH-Wertes rötlich-braun. Durch Spülen mit Leitungswasser wurde der pH-Wert erhöht und die Farbe schlug in blau um.

Dann erfolgte die Färbung des Zytoplasmas mit alkoholischem Eosin. Anschließend wurde das Wasser im Präparat durch Spülen mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (bis hin zu 100% Ethanol) entzogen. Dann wurde der Schnitt mit dem organischen Lösungsmittel Xylol geklärt und mit Eindeckmittel und einem Deckglas versehen.

#### 3.4.3 Elastica-van-Gieson-Färbung

Die Elastica-van-Gieson (EvG)-Färbung von Gewebeschnitten ist eine wichtige Methode zur Beurteilung von elastischen Fasern (z.B. bei der Diagnostik von größeren Blutgefäßen).

Die Zellkerne werden bei dieser Färbung rot und die elastischen Fasern blau-violett dargestellt. Das Zytoplasma und die Muskelzellen werden rötlich und kollagene Fasern rosa angefärbt.

### 3.4.3.1 Reagenzien

Weigert's: 80ml Weigert A (Hämatoxylin A) zu 80ml Weigert B (Hämatoxylin B)

HCl-Alkohol 0,5%: 80ml 25% HCl in 3920ml 100% Ethanol

96% Ethanol: 4,8l 100% Ethanol in 200ml destilliertem Wasser

70% Ethanol: 3,5l 100% Ethanol in 1,5l destilliertem Wasser

Resorcin-Fuchsin

Xylol

Picrofuchsin

### 3.4.3.2 Durchführung

Die Paraffinschnitte wurden zuerst mit Resorcin Fuchsin gefärbt. Der basische positiv geladene Farbstoff lagert sich an die saure negativ geladene Hüllschicht der elastischen Fasern an. Darauf folgte die Färbung mit Weigert's, wodurch die Zellkerne rot dargestellt wurden. Anschließend wurden das Bindegewebe und die kollagenen Fasern mithilfe von Picrofuchsin eingefärbt. Die Entwässerung des Präparates erfolgte ebenfalls mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (bis hin zu 100% Ethanol), um dann mit Xylol behandelt und eingedeckt zu werden.

### 3.4.4 Auswertung

Die histologische Auswertung der HE- und EvG-Schnitte erfolgte nach den Kriterien Fibrose, Entzündung, Gallengangsproliferation, Verfettung und Gruppennekrosen. Der Grad dieser Parameter wurde mit den Ziffern 0-3 angegeben (**Tabelle 3.1**).

0 = gar nicht
1 = gering
2 = mäßig
3 = hoch

**Tabelle 3.1: Histologie Legende**

### 3.5 Bestimmung der Laktatdehydrogenase im Perfusat

#### 3.5.1 Reagenzien

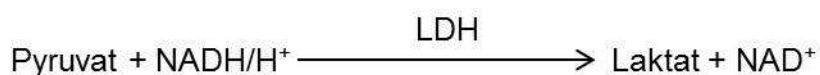
Phosphatpuffer 50mM, Pyruvat 0,6mM, pH 7,5:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,71 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,80 g/l
Pyruvat	jeweils 66 mg/l zu K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

NADH: 10mg in 1ml 0,5% NaHCO<sub>3</sub> auflösen

#### 3.5.2 Durchführung

Die vorliegende Menge Laktatdehydrogenase (LDH) im Perfusat wurde am Photometer (Ultrospec 3100 pro, amersham pharmacia biotech, Cambridge UK) bestimmt. Dazu wurde ein enzymatischer Test mit Messung der kinetischen Indikatorreaktion bei 365nm verwendet. Das bedeutet, die LDH-Aktivität verhält sich proportional zur NADH-Abnahme.



Das Perfusat wurde 1:1 mit Phosphatpuffer in eine Halb-Mikro-Küvette (Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht) gegeben und nach der Zugabe von NADH gemessen. Nach Ermittlung der registrierten Geraden im linearen Bereich ( $\Delta E = \Delta X / \Delta t$ ), wurde die LDH-Konzentration (mU/min x g Leber) in der Leber wie folgt berechnet:

$$c(\text{LDH}) = \frac{\Delta E}{3,34} \times \frac{\text{Testvolumen (=1010)}}{\text{Probenvolumen (=500)}} \times 1000 \times \frac{\text{Durchfluss}}{\text{Lebergewicht}}$$

### 3.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA gehört zu den Immunassay-Verfahren zur Detektion von Proteinen, Viren oder auch Hormonen. Dabei wird das nachzuweisende Antigen an einen spezifischen Antikörper gebunden. Ein weiterer Antikörper oder ein Antigen (je nach Assay-Methode) wird mit einem Enzym gekoppelt und bindet an den ersten Antikörper. Das Enzym katalysiert daraufhin die Umsetzung eines Substrates, dessen Reaktionsprodukt durch Farbumschlag nachgewiesen werden kann.

Die am häufigsten eingesetzten Enzyme sind Meerrettichperoxidase (HRP) und alkalische Phosphatase (AP).

#### 3.6.1 Thromboxan B<sub>2</sub> ELISA

Es handelt sich bei diesem Kit um einen kompetitiven ELISA, wobei freies Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) im Perfusat und ein TXB<sub>2</sub>-acetylcholinesterase (AChE)-Konjugat (TXB<sub>2</sub> Tracer) um eine begrenzte Anzahl von TXB<sub>2</sub>-spezifischen Antiserum-Bindungsstellen konkurrieren. Dabei ist das Antigen mit dem Enzym zur Umsetzung eines Substrates gekoppelt und löst den messbaren Farbumschlag aus.

##### 3.6.1.1 Reagenzien und Materialien

Zur Bestimmung von TXB<sub>2</sub> im Perfusat wurde der Thromboxan B<sub>2</sub> EIA Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor) verwendet.

Dieser enthielt folgende Reagenzien und Materialien:

Thromboxan B <sub>2</sub> EIA Antiserum	1 vial/100 dtn
Thromboxan B <sub>2</sub> AChE Indikator	1 vial/100 dtn
Thromboxan B <sub>2</sub> EIA Standard	1 vial
10-fach EIA Puffer	2 vials/10 ml
400-fach Waschpuffer	1 vial/ 5 ml
Polysorbat 20	1 vial/3 ml
Mouse Anti-Rabbit IgG belegte Platte	1 Platte
96-Well Abdeckfolie	1 Abdeckfolie
Ellman´s Reagenz	3 vials/100 dtn
EIA Indikator Farbstoff	1 vial
EIA Antiserum Farbstoff	1 vial

### 3.6.1.2 Durchführung

Perfusate, Standards (1,6-1000pg/ml TXB<sub>2</sub>), Antiserum und Indikator wurden in die bereits mit Mouse Anti-Rabbit IgG belegten Platten pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Platte wurde 5x gewaschen, um alle ungebundenen Reagenzien zu entfernen. Ellman's Reagenz wurde zu jedem Well gegeben und die Platte für weitere 90min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das Substrat für die AChE im Ellman's Reagenz löste eine enzymatische Reaktion aus mit einem Produkt, das eine unterschiedlich starke gelbe Farbe hat und dessen Absorption am GloMax®-Multi Microplate Reader bei 405nm gemessen wurde.

Die Intensität der Farbe war proportional zum Anteil an gebundenem TXB<sub>2</sub> Indikator, welcher wiederum indirekt proportional zum Anteil von, im Well vorhandenem, freien TXB<sub>2</sub> war.

Die TXB<sub>2</sub>-Konzentration (pg/ml x g Leber) in der Leber wurde im Anschluss mithilfe des Durchflusses und des Lebergewichtes wie folgt berechnet:

$$c(\text{TXB}_2) = \frac{\text{Menge TXB}_2 \text{ im Perfusat} \times \text{Durchfluss}}{\text{Lebergewicht}}$$

### 3.6.2 Tumornekrosefaktor α ELISA

Bei diesem Assay handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Das bedeutet es werden zwei spezifische Antikörper verwendet, die das gesuchte Antigen einschließen. Hier beinhaltet der Sekundärantikörper das Enzym zur Umsetzung des Substrates und somit zur Auslösung der messbaren Farbreaktion.

Die im verwendeten Kit enthaltene Mikrotiterplatte war bereits mit einem Ratte-Tumornekrosefaktor α (TNFα)-spezifischen Antikörper vorbehandelt.

#### 3.6.2.1 Reagenzien und Materialien

Zur Bestimmung von TNFα im Ratten-Serum wurde der Cymax™ Rat TNFα ELISA (Young In Frontier Co., Ltd., Seoul) verwendet.

Dieser enthielt folgende Reagenzien und Materialien:

96-Well Platte	1 Platte
20-fach Waschpuffer	2 vials/25 ml
Standard Protein	1 vial
Standard/Proben Puffer	1 vial/25 ml
Sekundärantikörper	1 vial
Streptavidin HRP	1 vial/150 µl
Sekundärantikörper/Streptavidin HRP Puffer	1 vial/25 ml
Substrat (TMB)	1 vial/15 ml
Stopplösung	1 vial/15 ml
Protokoll	1 Protokoll
96-Well Abdeckfolie	2 Abdeckfolien

### 3.6.2.2 Durchführung

Serumproben (20-fach verdünnt) und Standards (0-800pg/ml TNF $\alpha$ ) wurden in die Platte pipettiert und 2h bei 37°C inkubiert. Ungebundenes TNF $\alpha$  und andere Komponenten der Proben wurden durch 3x waschen entfernt. Der Sekundärantikörper wurde hinzugefügt und die Platte für 1h bei 37°C inkubiert. Erneut wurde 3x gewaschen und Streptavidin HRP wurde zur quantitativen Bestimmung des Anteils an TNF $\alpha$  in den Serumproben zu jedem Well gegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30min. bei 37°C wurde 3x gewaschen. Das TMB-Substrat wurde dazugegeben und die Platte im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach 5-10min. wurde die Reaktion mit der Stopplösung unterbrochen und das dabei entstandene Produkt verursachte eine Gelbfärbung der Proben. Die Absorption aller Wells wurde bei 450nm am GloMax®-Multi Mikroplate Reader gemessen. Ein Anstieg der Absorptionen war direkt proportional zum Anteil an erfasstem Ratten-spezifischem TNF $\alpha$ .

### 3.6.3 Interleukin 6 ELISA

Auch der Interleukin 6 (IL 6) ELISA beinhaltet einen Sandwich-ELISA, bei dem die enthaltene Mikrotiterplatte im Vorfeld mit einem Ratte-(IL 6)-spezifischen Antikörper belegt wurde.

### 3.6.3.1 Reagenzien und Materialien

Zur Bestimmung von IL 6 im Ratten-Serum wurde der Cymax Rat Interleukin 6 (IL 6) ELISA Kit (Young In Frontier Co., Ltd., Seoul) verwendet.

Dieser enthielt folgende Reagenzien und Materialien:

96-Well Platte	1 Platte
20-fach Waschpuffer	2 vials/25 ml
Standard Protein	1 vial
Standard/Proben Puffer	1 vial/25 ml
Sekundärantikörper	1 vial
Streptavidin HRP	1 vial/150 µl
Sekundärantikörper/Streptavidin HRP Puffer	1 vial/25 ml
Substrat (TMB)	1 vial/15 ml
Stoplösung	1 vial/15 ml
Protokoll	1 Protokoll
96-Well Abdeckfolie	2 Abdeckfolien

### 3.6.3.2 Durchführung

Serumproben (60-fach verdünnt) und Standards (0-4000pg/ml IL 6) wurden in die 96 Well Platte pipettiert und 2h bei 37°C inkubiert. Nach 3x Waschen, wurde der Sekundärantikörper dazugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Erneut wurde 3x gewaschen und Streptavidin HRP wurde zu jedem Well hinzugefügt. Nach weiteren 30min. Inkubation bei 37°C wurde wieder 3x gewaschen und anschließend erfolgte die Zugabe des Substrates TMB. Die Platte wurde im Dunkeln und bei RT für 5-10min. inkubiert, um dann die Reaktion mit der Stoplösung abubrechen. Das entstandene Produkt war durch Gelbfärbung der Proben zu erkennen und die Absorptionen wurden bei 450nm am GloMax®-Multi Mikroplate Reader gemessen. Ein Anstieg der Absorptionen war direkt proportional zum Anteil an erfasstem Ratten-spezifischem IL 6.

## 3.7 Bestimmung von klinischen-chemischen Parametern im Serum

### 3.7.1 Serumgewinnung

Den Tieren wurde nach einem *in vivo*-Versuch Blut aus der *V. cava caudalis* in ein Serum-Röhrchen (Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht) entnommen. Nach ca. 30-minütiger Gerinnung, wurde es bei RT und 3000rpm für 10min. zentrifugiert (Hettich EBA 8S, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen). Der Überstand (Serum) wurde in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

### 3.7.2 Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter

Eine Auswahl von klinisch-chemischen Parametern zur Beurteilung der Leberschädigung infolge der Ischämie-Reperfusion wurde am Institut für Laboratoriumsmedizin am Klinikum Großhadern der Universität München nach den aktuellen Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen analysiert.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

Parameter	Richtwerte
Aspartat-Aminotransferase (AST; 37°C)	<= 105 U/l
Alanin-Aminotransferase (ALT; 37°C)	<= 52 U/l
Laktatdehydrogenase (LDH; 37°C)	<= 1000 U/l



### 3.8 Quantitative Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) wird zur Vervielfältigung von DNA und RNA bzw. für Genexpressionsstudien genutzt, wobei die herkömmliche PCR erweitert wird, so dass eine Quantifizierung der Nukleinsäuren möglich ist. Dies geschieht mithilfe von Farbstoffen (wie SYBR Green und Ethidiumbromid), welche fluoreszieren, wenn sie in doppelsträngige DNA eingelagert und anschließend mit Licht angeregt werden. Nach jedem Zyklus der PCR wird die Fluoreszenz und somit auch die amplifizierte Menge an DNA gemessen, weshalb man auch von Echtzeit-PCR (Real-Time PCR) spricht. Die Zunahme der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Zunahme der neu gebildeten DNA.

Zur Durchführung einer RT-qPCR wurde zunächst die Gesamt-RNA aus den Rattenlebern isoliert und quantifiziert. Dann erfolgte mit reverser Transkription die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus der gewonnenen RNA, welche wiederum in der RT-qPCR eingesetzt wurde.

#### 3.8.1 Gesamt-Ribonukleinsäure-Isolierung

##### 3.8.1.1 Reagenzien und Materialien

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Lebergewebe wurde der miRNeasy® Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet.

Dieser enthielt folgende Reagenzien und Materialien:

RNeasy® Mini Säulen	50 St.
Sammelgefäße (1,5ml)	50 St.
Sammelgefäße (2ml)	50 St.
QIAzol® Lysereagenz	50 ml
Puffer RWT	15 ml
Puffer RPE	11 ml
RNase-freies Wasser	10 ml
Protokoll	1 St.

### 3.8.1.2 Durchführung

Bis auf die Phasenseparation wurden alle Schritte der Isolation bei RT durchgeführt. Zunächst wurden 10-15mg pro Leber (gefroren in flüssigem Stickstoff) abgewogen, 700µl QIAzol® Lysereagenz dazugegeben und die Proben mechanisch homogenisiert (Polytron®, PT 1200, KINEMATICA AG, Littau/Luzern). Nach einer Inkubationszeit von 5min. wurden jeder Probe 140µl Chloroform hinzugefügt und 15sec. gevortext. Die Proben wurden 2-3min. inkubiert und im Anschluss bei 4°C und 12.000g für 15min. zentrifugiert. Dieser Schritt diente der Phasentrennung. Die oberste klare Phase wurde abgenommen und mit 1,5 Volumen 100% Ethanol versetzt. Die Proben wurden auf die RNeasy® Mini Säulen gegeben und durch Zentrifugation für 15sec. bei 10.000rpm (Eppendorf MiniSpin®, Eppendorf AG, Hamburg) auf die Membran der Säulen übertragen. Nach dem Waschen mit Puffer RWT (1x) und Puffer RPE (2x), wurde die Gesamt-RNA von der Membran mit 2x50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Direkt im Anschluss wurde die gewonnene Gesamt-RNA quantifiziert und deren Reinheit bestimmt.

### 3.8.1.3 Gesamt-Ribonukleinsäure-Quantifizierung

Die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte photometrisch (Ultrospec 3100 pro, amersham pharmacia biotech, Cambridge UK) bei 260nm ( $A_{260}$ ). Eine Absorption von 1 Einheit bei 260nm (pH 7,5) korrespondiert mit 44µg RNA pro ml ( $A_{260}=1 \rightarrow 44\mu\text{g/ml}$ ). Zusätzlich wurde, zur Detektion der Reinheit der Gesamt-RNA, die Absorption bei 280nm ( $A_{280}$ ) gemessen. Reine Gesamt-RNA hat ein  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis von 1,8-2,0. Starke Absorptionen bei 280nm deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. Nach der Quantifizierung wurden die Proben bei -80°C eingefroren und gelagert.

### 3.8.2 Komplementäre Desoxyribonukleinsäure-Synthese

#### 3.8.2.1 Reagenzien

Die zuvor isolierte Gesamt-RNA wurde zur Untersuchung in einer RT-qPCR mit dem RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen GmbH, Hilden) in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben.

Dieser enthielt folgende Reagenzien:

2 Gefäße 5X gDNA Eliminations-Puffer (GE)	je 50 µl
2 Gefäße 5X Reverse-Transkription-Puffer 3 (BC3)	je 100 µl
2 Gefäße Nuklease-freies Wasser (H <sub>2</sub> O)	je 1 ml
2 Gefäße Primer (Random Hexamer und Oligo-dT) und Kontroll-Mix (P2)	je 25 µl
2 Gefäße RT Enzym-Mix 3 (RE3)	je 50 µl

#### 3.8.2.2 Durchführung

Zuerst wurde ein gDNA Eliminationsmix für jede Probe Gesamt-RNA hergestellt (**Tabelle 3.2**), 5min. bei 42°C inkubiert und dann sofort auf Eis gestellt.

Gesamt-RNA	0,5 µg
Puffer GE	2 µl
H <sub>2</sub> O	variabel
Gesamtvolumen	10 µl

**Tabelle 3.2: gDNA Eliminationsmix**

Im Anschluss wurde der Reverse-Transkription-Mix angesetzt (**Tabelle 3.3**), von dem 10µl zu jeder Probe gDNA Eliminationsmix gegeben wurden. Nun erfolgte eine Inkubation bei 42°C für 15min. und direkt nachfolgend bei 95°C für 5min., um die Reaktion zu stoppen. Abschließend wurde jede Probe mit 91µl Nuklease-freiem Wasser vermennt und entweder auf Eis gestellt (bei sofortigem Einsatz in der RT-qPCR) oder bei -20°C gelagert.

Puffer BC3	4 µl
Kontrolle P2	1 µl
RT Mix RE 3	2 µl
H <sub>2</sub> O	3 µl
Gesamtvolumen	10 µl

**Tabelle 3.3: Reverse-Transkription-Mix (für 1 Probe)**

### 3.8.3 Custom RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array

#### 3.8.3.1 Reagenzien und Materialien

Zur Durchführung einer RT-qPCR wurden ein selbst zusammengestelltes Custom RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Format A (Qiagen GmbH, Hilden) und der RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX<sup>TM</sup> qPCR Mastermix (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Die 96-Well-Mikrotiterplatten des Custom RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays waren bereits mit den Primern für alle Gene belegt.

Folgende Zielgene wurden untersucht:

Gensymbol	Offizielle Bezeichnung	Referenzsequenz
<i>Ccl2</i>	<i>Chemokin (C-C Muster) Ligand 2</i>	NM_031530
<i>IL 18</i>	<i>Interleukin 18</i>	NM_019165
<i>IL 1b</i>	<i>Interleukin 1 beta</i>	NM_031512
<i>IL 6</i>	<i>Interleukin 6</i>	NM_012589
<i>TNF</i>	<i>Tumornekrosefaktor</i>	NM_012675
<i>Casp8</i>	<i>Caspase 8</i>	NM_022277
<i>Ripk1</i>	<i>Rezeptor-interagierende Proteinkinase 1</i>	NM_001107350
<i>Ripk3</i>	<i>Rezeptor-interagierende Proteinkinase 3</i>	NM_139342
<i>Actb</i>	<i>Aktin, beta</i>	NM_031144
<i>B2m</i>	<i>Beta-2 Mikroglobulin</i>	NM_012512

*Actb* und *B2m* dienen bei diesem Array als Housekeeping Gene. Dabei handelt es sich um Gene, die extrem wichtig für die Zellen sind und daher ubiquitär und konstant exprimiert werden. Sie können somit als Referenz bzw. zur Berechnung der Zielgene verwendet werden.

### 3.8.3.2 Durchführung

Für jede Probe cDNA wurde ein PCR Komponenten-Mix angesetzt (**Tabelle 3.4**) und 25 µl davon in jedes Well des Custom RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays gegeben. Nach dem Verschließen des Arrays mit Optical Thin-Wall 8-Cap Strips (Qiagen GmbH, Hilden), wurde es zur Entfernung aller Luftblasen aus den Wells für 1 min. bei RT und 1000g zentrifugiert (Hettich Universal 320R, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen) und auf Eis gestellt. Der real-time Cycler (Eppendorf® Mastercycler® ep realplex 4S, Eppendorf AG, Hamburg) wurde kalibriert und programmiert, um anschließend das Array hineinzustellen und das PCR Programm (**Tabelle 3.5**) zu starten.

Die Werte der verschiedenen Genexpressionen wurden mithilfe der Housekeeping Gene *Actb* und *B2m* mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ quantifiziert (**Bild 3.4**). Es wurde also das Verhältnis von einer Gruppe (Kontrolle) zur anderen (Intervention) bestimmt. Der  $C_T$ -Wert gibt dabei den Zyklus der RT-qPCR an, ab dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrundsignal abhebt und somit messbar ist.

RT <sup>2</sup> SYBR Green Mastermix	13,75 µl (50%)
cDNA	1,045 µl (3,8%)
RNase-freies Wasser	12,705 µl (46,2%)
Gesamtvolumen	27,5 µl (100%)

**Tabelle 3.4: PCR Komponenten-Mix (für 1 Probe und 1 Well)**

Programm	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Hitzeaktivierung	95	10min.	1
PCR Zyklus	95	15sec.	40
	60	1min.	
Schmelzkurve	95	15sec.	1
	60	15sec.	
		20min.	
	95	15sec.	

**Tabelle 3.5: PCR Programm**

$\Delta C_T = C_{T(\text{Zielgen})} - C_{T(\text{Housekeeping Gen})}$
$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Intervention})} - \Delta C_{T(\text{Kontrolle})}$
Verhältnis = $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$

**Bild 3.4: Relative Quantifizierung mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode**

### 3.9 Statistik

Die Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2010 und Microsoft Power Point 2010. In den Diagrammen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standard error of the mean (SEM) bzw. Mittelwerte  $\pm$  Standard deviation (SD) angegeben.

Die Signifikanzen der erhobenen Daten wurden mit dem Two Sample Student's t-test oder dem Mann-Whitney-U-test ermittelt, wobei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet wird.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Histologische Auswertungen

Proben aller Lebern wurden nach den Perfusionen bzw. *in vivo*-Versuchen am Pathologischen Institut der Medizinischen Fakultät der LMU München durch Frau Prof. Dr. med. Doris Mayr und Frau Dr. med. Marie-Christine Makeschin untersucht und ausgewertet. Von allen Lebern wurden HE- und EvG-Färbungen angefertigt.

So sollten einerseits die verschiedenen Lebermodelle charakterisiert und bestätigt werden und andererseits anhand des Entzündungsstatus eine Aussage zur Wirkung der IPostC gemacht werden.

#### 4.1.1 Kalte Ischämie *in situ* ± IPostC

Die gesunden Lebern wiesen nach 24h Ischämie mit und ohne IPostC eine sehr geringe und fokal feintropfige Verfettung auf. Die Fettlebern dagegen zeigten eine sehr geringe periportale und perizentrale Fibrose und eine starke feintropfige Verfettung (**Tabelle 4.1**).

Eine Entzündung war histologisch in beiden Lebermodellen nicht nachzuweisen, aber es war eine granulozytäre Abräumreaktion um degenerierte bzw. nekrotische Hepatozyten erkennbar. Des Weiteren waren in gesunden Lebern und Fettlebern Nekrose-Vorstufen und Einzelzellnekrosen sowie konfluierende Zytoplasmadegenerationen mit Kernaufhellung, aber kaum Kernverlust, zu sehen (**Tabelle 4.1**).

Ein Effekt durch die IPostC konnte nicht nachgewiesen werden, da das histologische Bild (**Bild 4.1**) der Lebern zu inhomogen war.

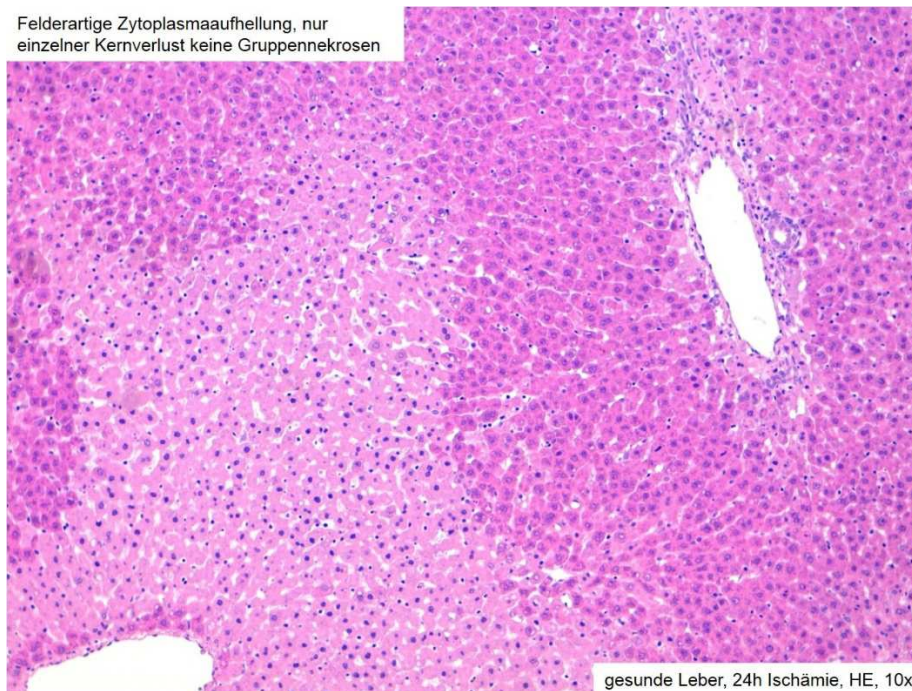


Lebermodell	IRI-Parameter	Bemerkungen
gesund	Fibrose: 0	
	Entzündung: 0	aber granulozytäre Abraumreaktion um degenerierte bzw. nekrotische Hepatozyten
	Gallengangsproliferation: 0	
	Verfettung: 1	sehr gering und fokal feintropfig
	Gruppennekrosen: 0	konfluierende feldartige Zytoplasmadegeneration, Auflockerung, Kernaufhellung, überwiegend kein Kernverlust; Nekrose-Vorstufen; Einzelzellnekrosen
Fettleber	Fibrose: 1	sehr gering periportal/perizentral
	Entzündung: 0	aber granulozytäre Abraumreaktion um degenerierte bzw. nekrotische Hepatozyten
	Gallengangsproliferation: 0	
	Verfettung: 3	feintropfig
	Gruppennekrosen: 0	konfluierende feldartige Zytoplasmadegeneration, Auflockerung, Kernaufhellung, überwiegend kein Kernverlust; Nekrose-Vorstufen; Einzelzellnekrosen

**Tabelle 4.1: Histologische Auswertung kalte Ischämie in situ**

**A**

Felderartige Zytoplasmadegeneration, nur einzelner Kernverlust keine Gruppennekrosen

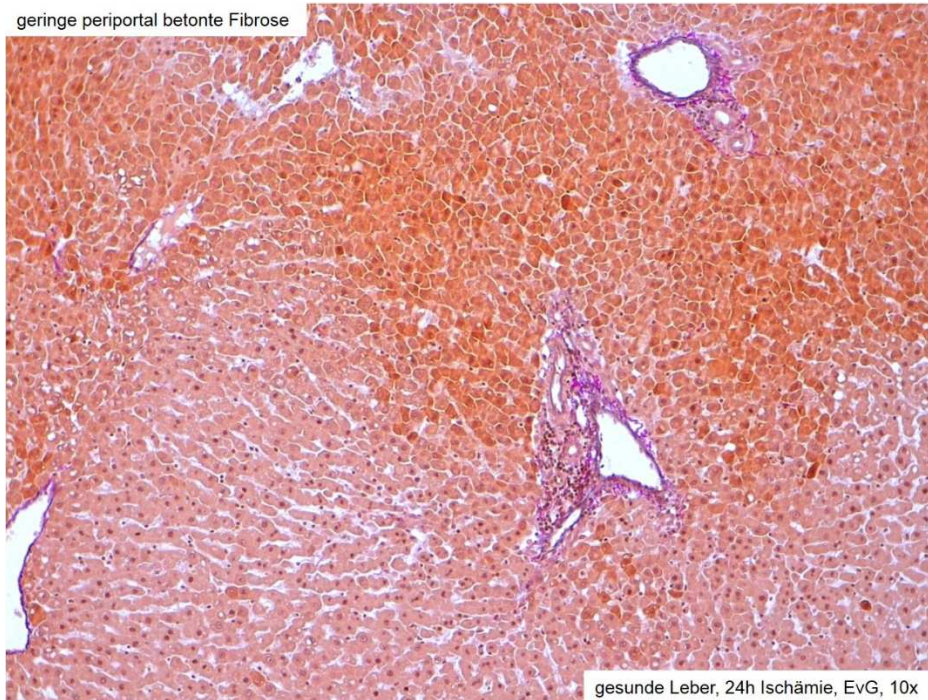


gesunde Leber, 24h Ischämie, HE, 10x



**B**

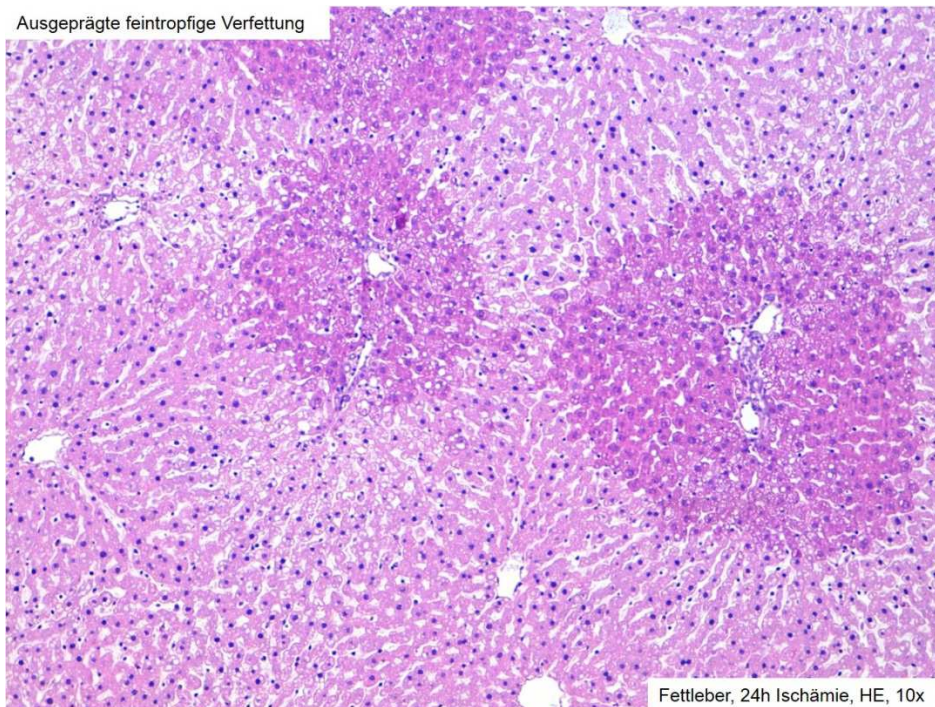
geringe periportal betonte Fibrose



gesunde Leber, 24h Ischämie, EvG, 10x

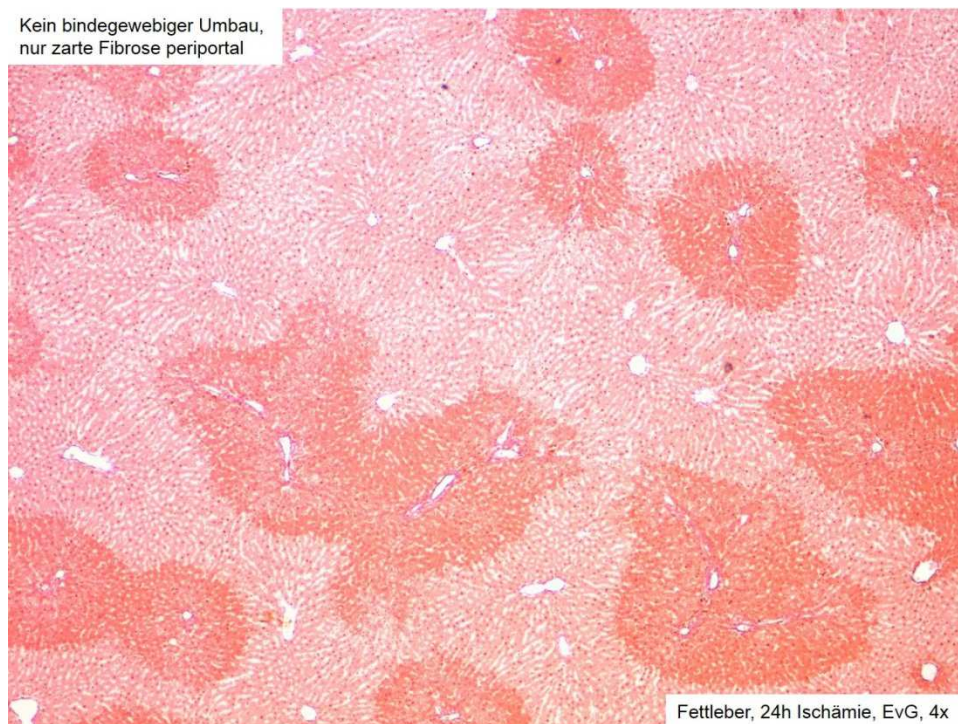
**C**

Ausgeprägte feintropfige Verfettung



Fettleber, 24h Ischämie, HE, 10x



**D**

**Bild 4.1: HE- und EvG-Färbungen nach kalter Ischämie *in situ***

Die Lebern wurden 30min. anperfundiert, 24h bei 4°C gelagert und anschließend 120min. reperfundiert (gesund Leber und Fettleber je n=8). Paraffinschnitte der Lebern wurden gefärbt und histologisch ausgewertet (wie unter 3.4 beschrieben). Abgebildet sind jeweils HE- und EvG-Färbung einer gesunden Leber (**A** HE, **B** EvG) und einer Fettleber (**C** HE, **D** EvG) nach Ischämie und Reperfusion.

#### 4.1.2 Warme Ischämie *in situ* ± IPostC

Nach 90min. warmer Ischämie mit und auch ohne IPostC war in den gesunden Lebern eine geringe Entzündung mit Einzelzellnekrosen, Apoptosen und Mitosen sowie eine mäßige kleintropfige Verfettung zu beobachten. Außerdem zeigten die Lebern diffus Gruppennekrosen mit Zellen ohne klaren Kernverlust, aber mit Farbverlust und aufgelockertem Zytoplasma (**Tabelle 4.2**).

Die BDL 4Wo.-Lebern wiesen im Parenchym diffus verteilte stark ausgeprägte Gallengangsproliferationen mit geringen fibrotischen Septen auf. Verfettung und Gruppennekrosen waren nur gering vorhanden und die mäßige Entzündung war durch Einzelzellnekrosen, Apoptosen und Mitosen gekennzeichnet (**Tabelle 4.2**).

In den TAA 18Wo.-Lebern war eine mäßige Fibrose mit Fibroblastenproliferation und fokal konfluierenden Septen sowie eine mäßige Gallengangsproliferation mit Herden

von Gefäßproliferaten ausgeprägt. Es war außerdem eine gemischte Entzündung mit Einzelzellnekrosen, Apoptosen und Mitosen sowie eine überwiegend chronische fokal eitrig-destruierende Cholangitis zu beobachten. Eine kleintropfige Verfettung und Gruppennekrosen mit fokal beginnendem bindegewebigen Umbau waren nur geringfügig zu sehen (**Tabelle 4.2**).

Auch nach der warmen Ischämie war die Histologie der Lebern mit und ohne Intervention zu inhomogen (**Bild 4.2**), um eine Aussage zur Wirkung der IPostC zu machen.

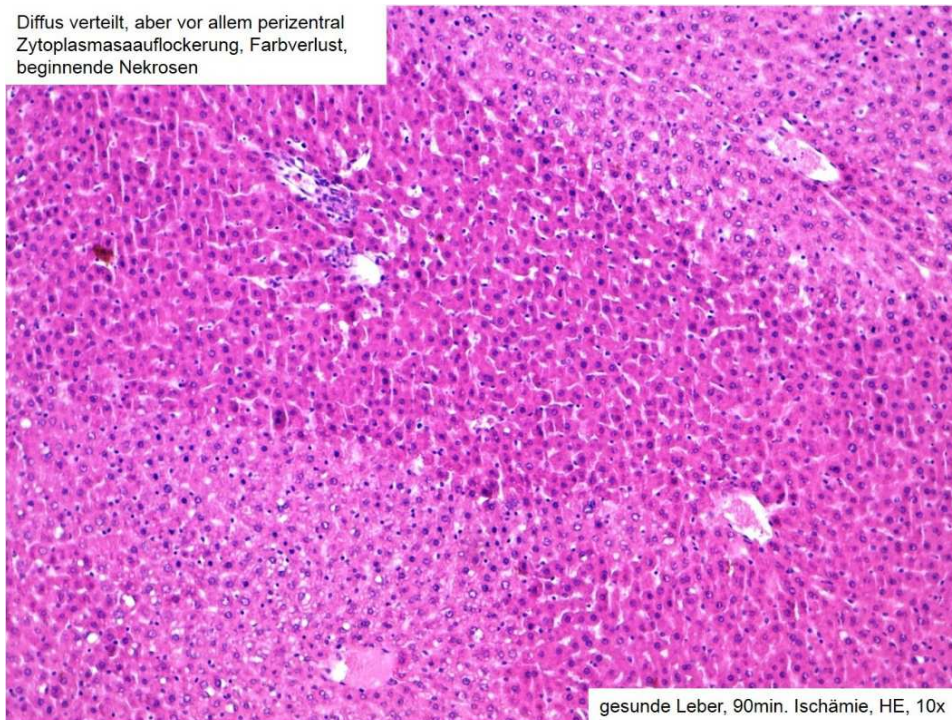
Lebermodell	IRI-Parameter	Bemerkungen
gesund	Fibrose: 0	
	Entzündung: 1	Einzelzellnekrosen; Apoptosen; Mitosen
	Gallengangsproliferation: 0	
	Verfettung: 2	kleintropfig
	Gruppennekrosen: 2	diffus; Zellen ohne klaren Kernverlust, aber mit Farbverlust; aufgelockertes Zytoplasma
BDL	Fibrose: 1	Septen im Bereich der Gallengangsproliferation
	Entzündung: 2	Einzelzellnekrosen; Apoptosen; Mitosen
	Gallengangsproliferation: 3	im gesamten Parenchym diffus verteilt
	Verfettung: 1	sehr gering kleintropfig
	Gruppennekrosen: 1	
TAA	Fibrose: 2	Fibroblastenproliferation; fokal konfluierende Septen
	Entzündung: 2	gemischt; überwiegend chronische fokal eitrig-destruierende Cholangitis; Einzelzellnekrosen; Apoptosen; Mitosen
	Gallengangsproliferation: 2	plus Herde von Gefäßproliferaten und Fibroblastenproliferation
	Verfettung: 1	sehr gering kleintropfig
	Gruppennekrosen: 1	fokal mit beginnendem bindegewebigen Umbau

**Tabelle 4.2: Histologische Auswertung warme Ischämie in situ**



**A**

Diffus verteilt, aber vor allem perizentral  
Zytoplasmasauflockerung, Farbverlust,  
beginnende Nekrosen



**B**

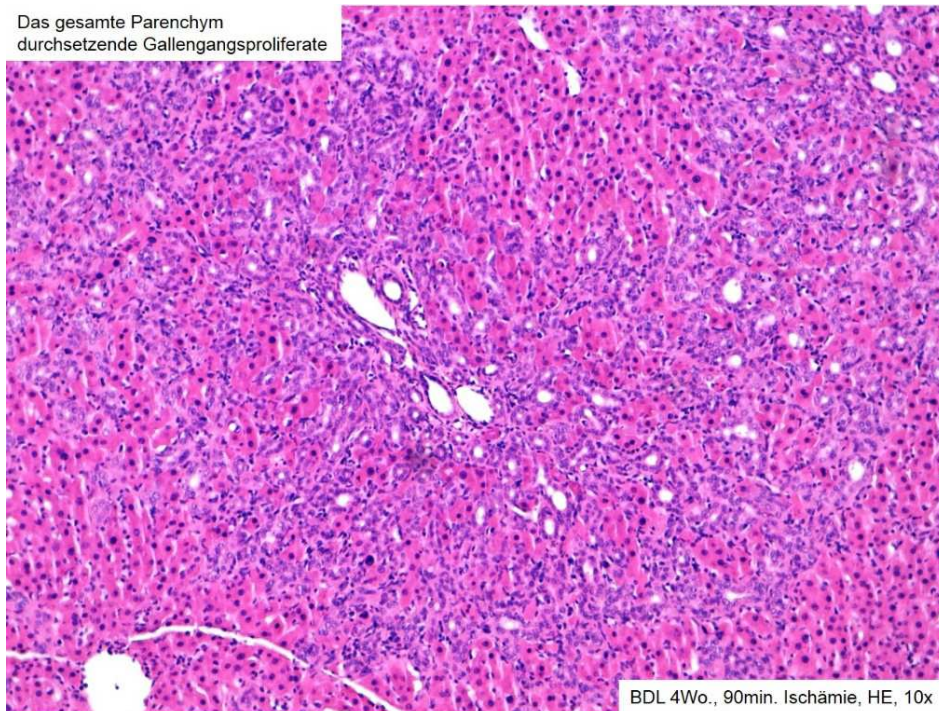
Keine auffällige Fibrose





**C**

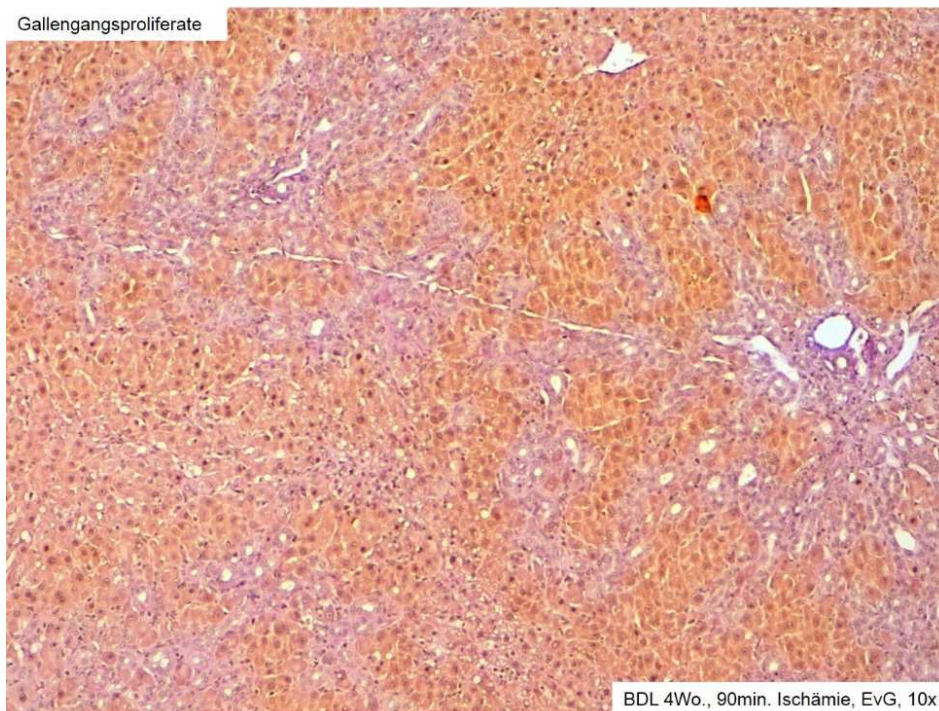
Das gesamte Parenchym  
durchsetzende Gallengangsproliferate



BDL 4Wo., 90min. Ischämie, HE, 10x

**D**

Gallengangsproliferate

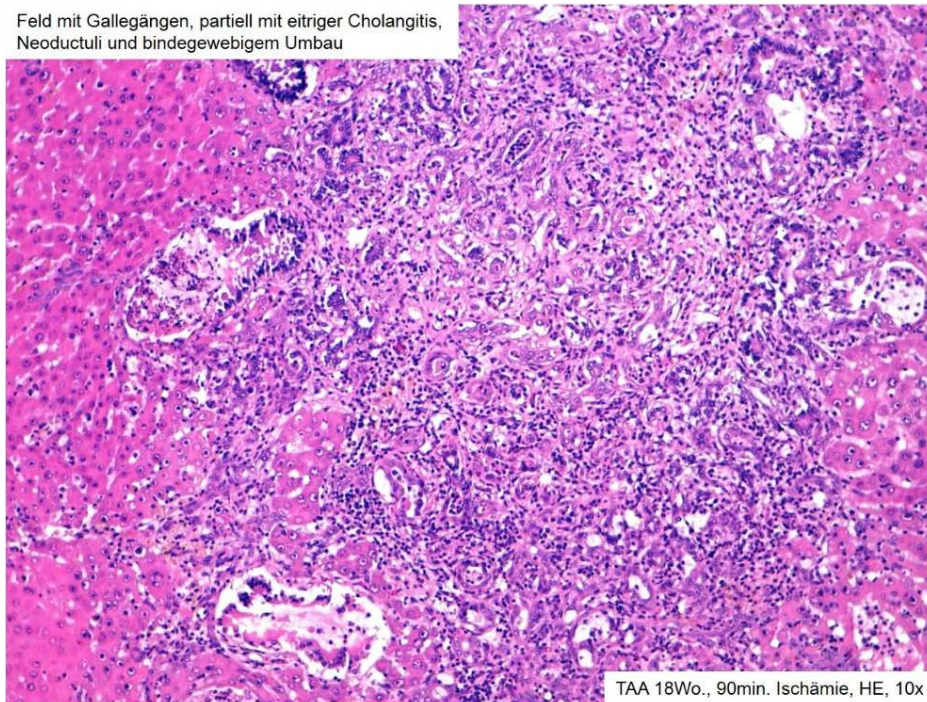


BDL 4Wo., 90min. Ischämie, EvG, 10x



**E**

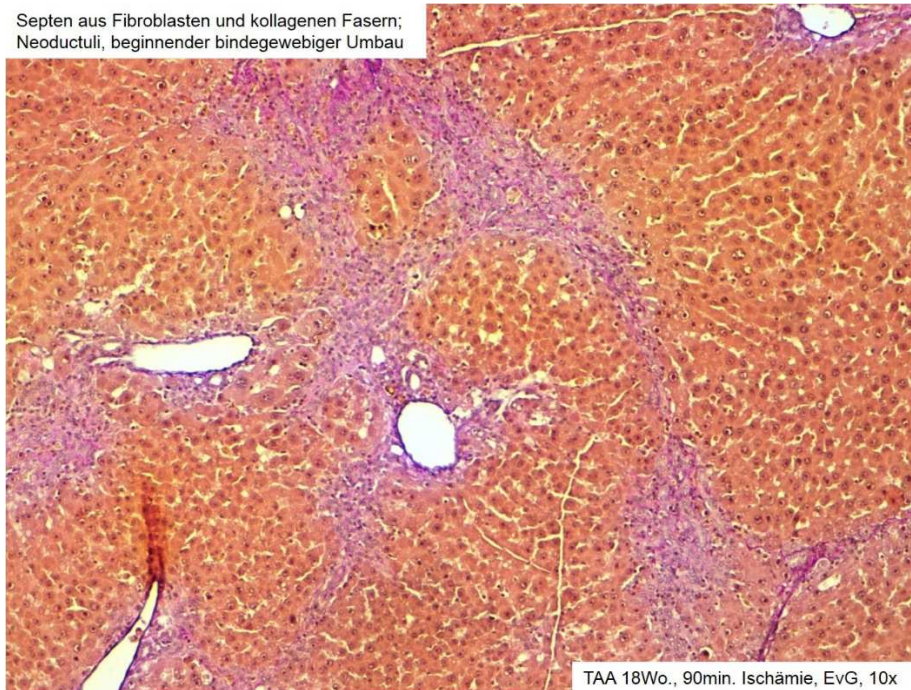
Feld mit Gallegängen, partiell mit eitriger Cholangitis,  
Neoductuli und bindegewebigem Umbau



TAA 18Wo., 90min. Ischämie, HE, 10x

**F**

Septen aus Fibroblasten und kollagenen Fasern;  
Neoductuli, beginnender bindegewebiger Umbau



TAA 18Wo., 90min. Ischämie, EvG, 10x

#### **Bild 4.2: HE- und EvG-Färbungen nach warmer Ischämie in situ**

Die Lebern wurden 30min. anperfundiert, um dann 90min. bei 37°C gelagert und anschließend 90min. reperfundiert zu werden (gesunde Leber, BDL 4Wo. und TAA 18Wo. je n=8). Paraffinschnitte der Lebern wurden gefärbt und histologisch ausgewertet (wie unter 3.4 beschrieben). Abgebildet sind jeweils HE- und EvG-Färbung einer gesunden Leber (**A** HE, **B** EvG), einer BDL 4Wo.-Leber (**C** HE, **D** EvG) und einer TAA 18Wo.-Leber (**E** HE, **F** EvG) nach Ischämie und Reperfusion.

### 4.1.3 Warme Ischämie *in vivo* ± IPostC

Die Versuchsgruppe sham 90min. zeigte histologisch als einzige Veränderung eine fedrige Degeneration der Hepatozyten, jedoch ohne Kernverlust und Nekrosen (**Tabelle 4.3**).

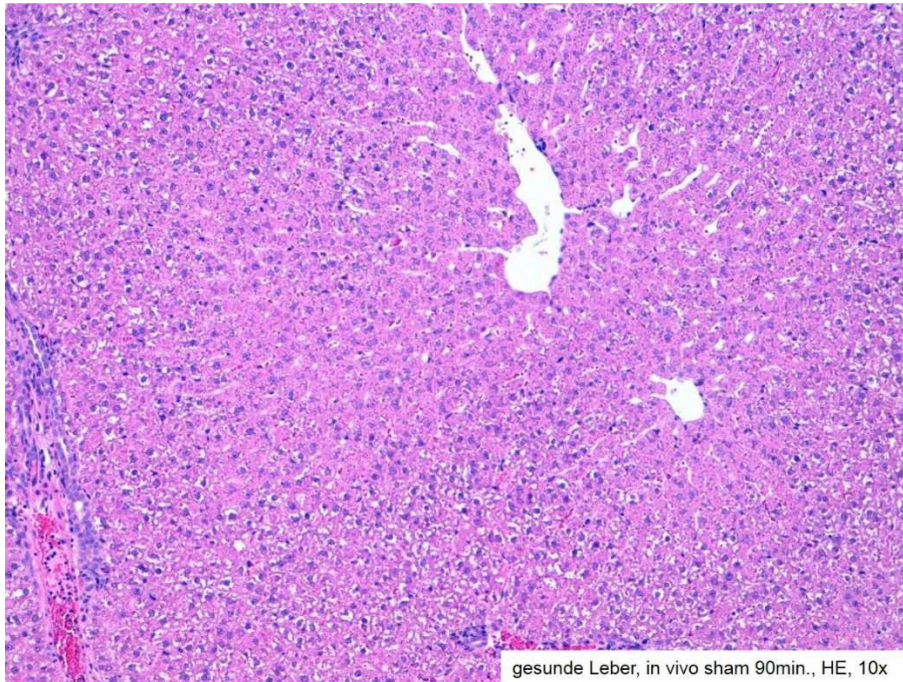
Nach 90min. warmer Ischämie *in vivo* war das histologische Bild mit und ohne IPostC sehr inhomogen (**Bild 4.3**) und ohne Hinweis auf einen Effekt durch die Intervention. Die Lebern zeigten eine geringe feintropfige Verfettung sowie eine geringgradige Entzündung mit fokalen periportalen Granulozyteninfiltraten und einer Abräumreaktion um Einzelzellnekrosen. Gruppennekrosen waren nicht zu beobachten, aber konfluierende feldartige Zytoplasmadegeneration mit Kernaufhellung, jedoch kaum Kernverlust (**Tabelle 4.3**).

Versuchsgruppe	IRI-Parameter	Bemerkungen
sham 90min.	Fibrose: 0	
	Entzündung: 0	
	Gallengangsproliferation: 0	
	Verfettung: 0	
	Gruppennekrosen: 0	fedrige Degeneration der Hepatozyten, kein Kernverlust, keine Nekrosen
90min. Ischämie	Fibrose: 0	
	Entzündung: 1	fokal periportale Granulozyteninfiltrate; Abräumreaktion um Einzelnekrosen
	Gallengangsproliferation: 0	
	Verfettung: 1	gering feintropfig
	Gruppennekrosen: 0	konfluierende feldartige Zytoplasmadegeneration, Kernaufhellung, überwiegend kein Kernverlust; Einzelzellnekrosen

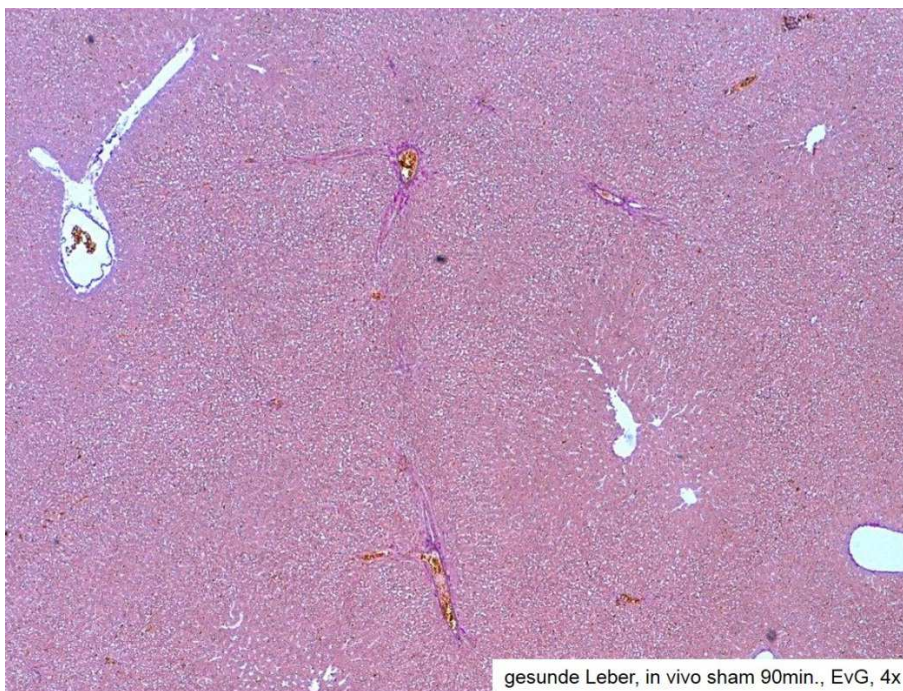
**Tabelle 4.3: Histologische Auswertung warme Ischämie *in vivo***



**A**



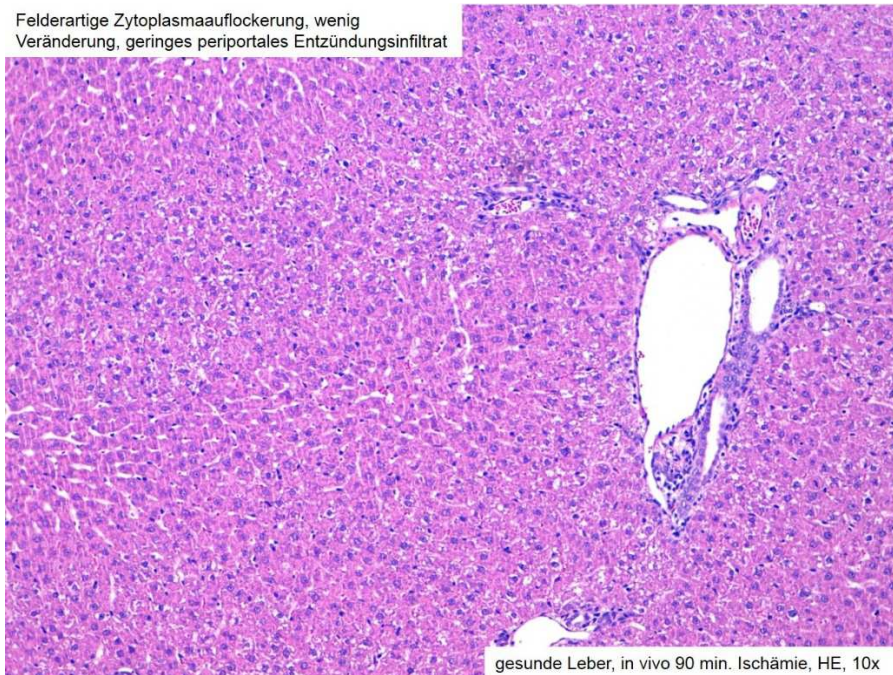
**B**





**C**

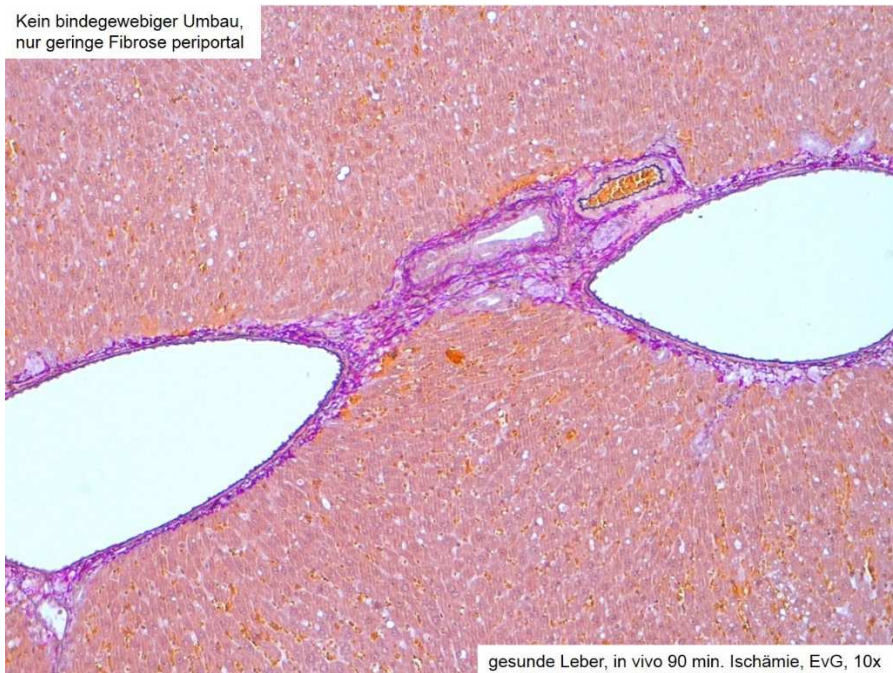
Felderartige Zytoplasmaauflockerung, wenig  
Veränderung, geringes periportales Entzündungsinfiltrat



gesunde Leber, in vivo 90 min. Ischämie, HE, 10x

**D**

Kein bindegewebiger Umbau,  
nur geringe Fibrose periportal



gesunde Leber, in vivo 90 min. Ischämie, EvG, 10x

### **Bild 4.3: HE- und EvG-Färbungen nach warmer Ischämie in vivo**

Die Lebern wurden einer partiellen 90-minütigen Ischämie bei 37°C und anschließend 90min. Reperfusion bzw. für sham 90+90min. Perfusion ausgesetzt (je n=8).

Paraffinschnitte der Lebern wurden gefärbt und histologisch ausgewertet (wie unter 3.4 beschrieben). Abgebildet sind jeweils HE- und EvG-Färbung der Versuchsgruppe sham 90min. (**A** HE, **B** EvG) und 90min. Ischämie (**C** HE, **D** EvG).

## 4.2 Laktatdehydrogenase, Gallefluss und portaler Perfusionsdruck nach IPostC

Für die isolierten Rattenleberperfusionen wurden zunächst drei Parameter erhoben: die LDH im Perfusat (wie unter 3.5 beschrieben) als Indikator für die Ausprägung des Zellschadens, der Gallefluss zur Darstellung der Organfunktion und der portale Perfusionsdruck, um mögliche Umbauprozesse in der Leber zu detektieren.

Bei kalter und warmer Ischämie *in situ* wurden jeweils die Gesamt-LDH und der Gesamt-Gallefluss ermittelt, wobei „Gesamt“ für die Galle die Menge umfasst, die in der kompletten Reperfusionzeit (120min. bei kalter Ischämie; 90min. bei warmer Ischämie) von der Leber gebildet wurde. Für die LDH bedeutet „Gesamt“ die Addition einzelner Messwerte an LDH im Perfusat, das zu definierten Zeitpunkten der Reperfusion (Minute 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 und 120 bei kalter Ischämie; Minute 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 und 90 bei warmer Ischämie) abgenommen wurde.

Außerdem wurden LDH und Gallefluss im zeitlichen Verlauf der Reperfusion, also in der frühen Phase (0-60min. bei kalter Ischämie; 0-40min. bei warmer Ischämie) und der späten Phase (70-120min. bei kalter Ischämie; 50-90min. bei warmer Ischämie), dargestellt.

Der portale Perfusionsdruck wurde als Maximalwert (höchster Druck) und als Endwert (letzter gemessener Druck) der Reperfusion angegeben.

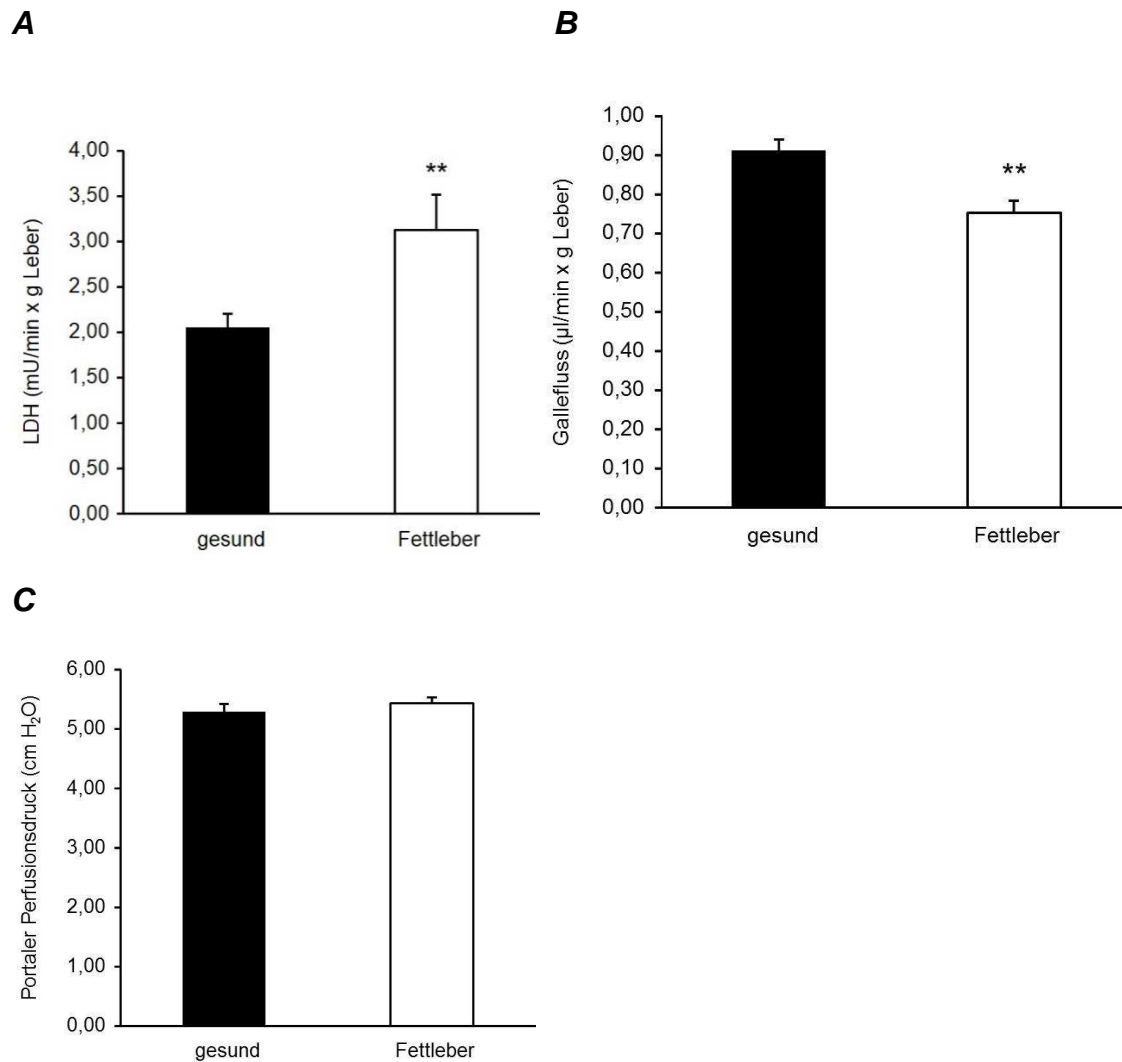
Die Basalwerte der Anperfusion für LDH, Gallefluss und portalen Perfusionsdruck wurden ebenfalls für die einzelnen Lebermodelle ermittelt und dargestellt.

Bei den „Folgeperfusionen“ wurden jeweils für LDH, Gallefluss und portalen Perfusionsdruck der Maximalwert angegeben und für LDH und Gallefluss zusätzlich der Gesamtwert (Menge über komplette Perfusionszeit von 80min.).

### 4.2.1 Kalte Ischämie *in situ* ± IPostC

Die kalte Ischämie *in situ* wurde mit gesunden und mit Fettlebern durchgeführt.

Die Basalwerte der 30-minütigen Anperfusion für LDH, Gallefluss und portalen Perfusionsdruck sind in **Bild 4.4 A-C** dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in der Fettleber die LDH deutlich erhöht, der Gallefluss deutlich erniedrigt und der portale Perfusionsdruck nahezu gleich zur gesunden Leber ist.

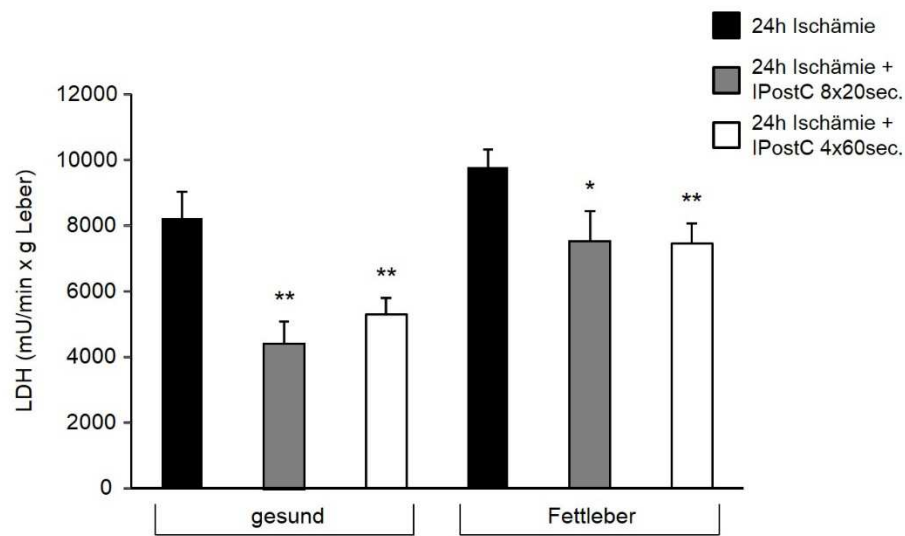
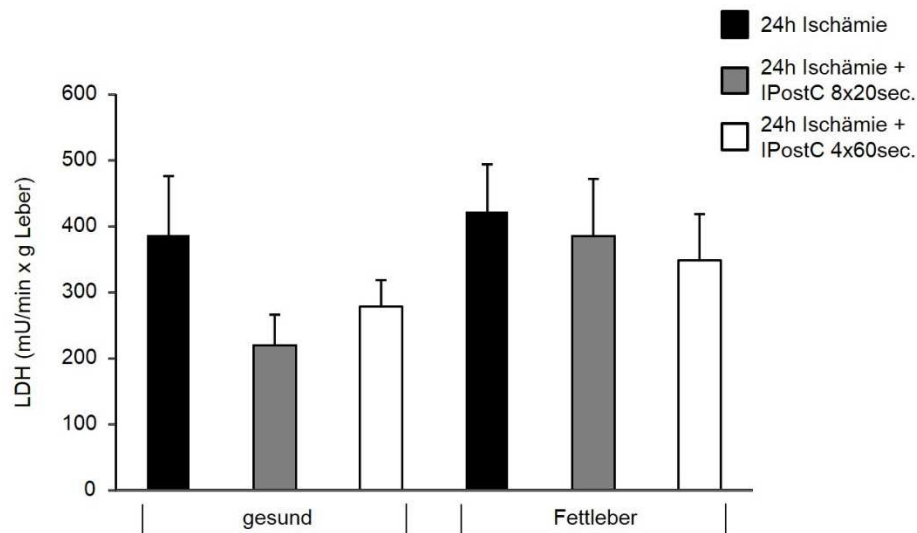
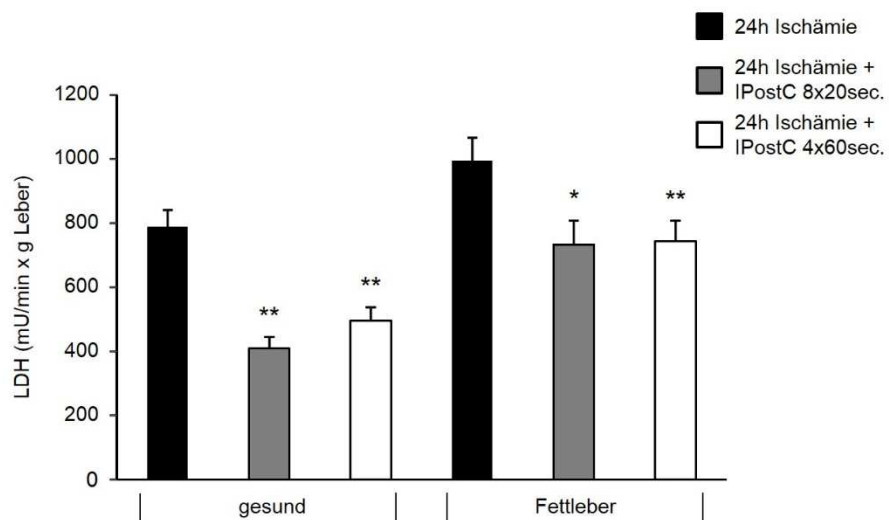


**Bild 4.4: Basalwerte von LDH (A), Gallefluss (B) und portalem Perfusionsdruck (C)**

Die Lebern wurden 30min. über die Portalvene perfundiert. Die LDH wurde im Perfusat gemessen (wie unter 3.5 beschrieben), die Galle gewogen und der portale Druck per Wassersäule abgelesen. Es sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM von je  $n=24$  mit einer Signifikanz bei  $**p<0,01$  (Two Sample Student's t-test) dargestellt.

Nach der Ischämie und Reperfusion sehen wir bei beiden Interventionsgruppen der IPostC (8x20sec. und 4x60sec.) eine signifikante Reduktion der Gesamt-LDH (**Bild 4.5A**) in gesunden und auch in Fettlebern.

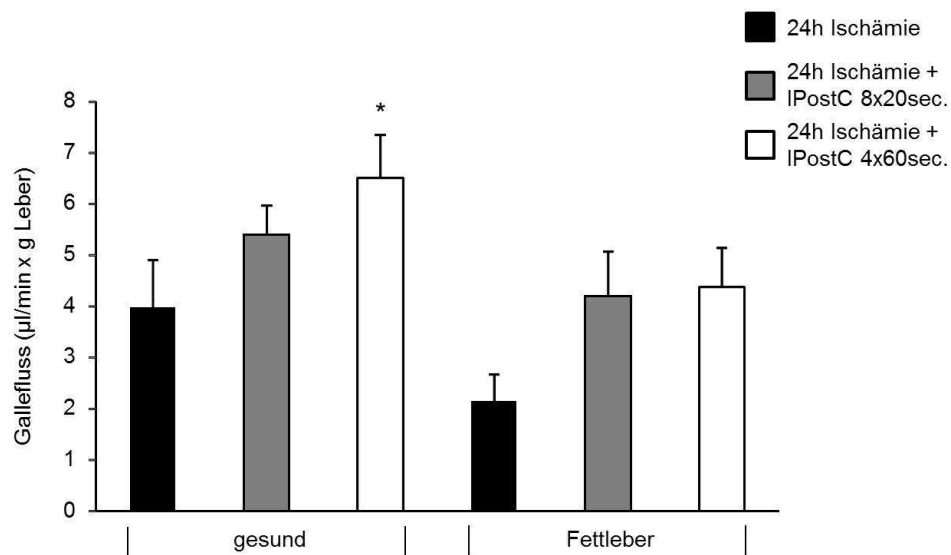
Der zeitliche Verlauf zeigt in der frühen Phase (**Bild 4.5B**) der Reperfusion noch keine sichtbare Reduktion der LDH. In der späten Phase jedoch ist die LDH bei beiden Lebermodellen und jeweils auch in beiden Interventionsgruppen signifikant gesenkt (**Bild 4.5C**).

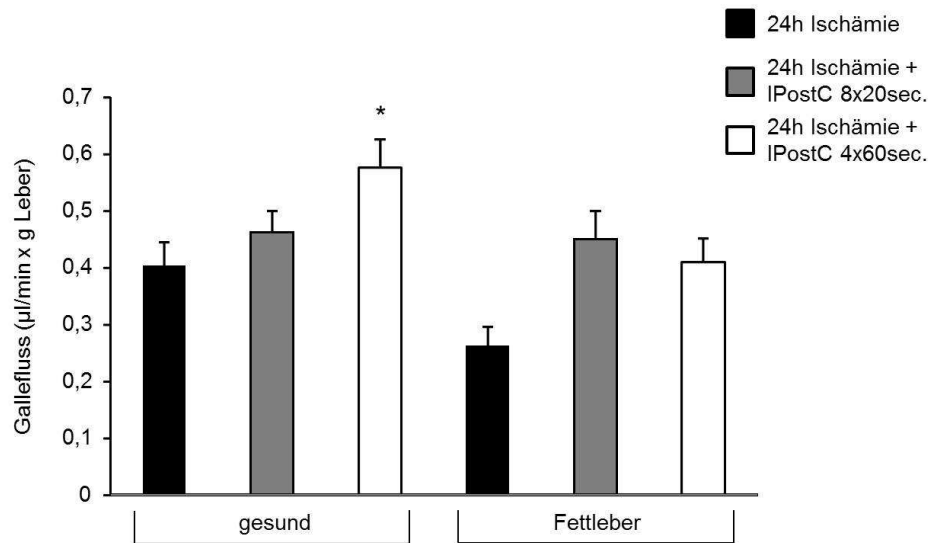
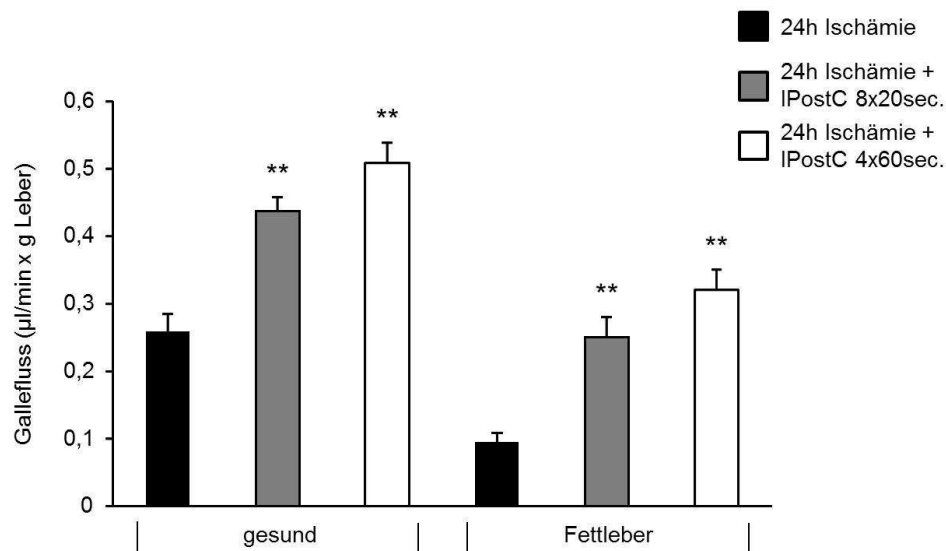
**A****B****C**

**Bild 4.5: LDH nach kalter Ischämie in situ ± IPostC**

Gesunde Lebern und Fettlebern wurden nach 30min. Anperfusion 24h bei 4°C gelagert und anschließend 120min. reperfundiert. Für die Interventionsgruppen wurde im Anschluss an die Ischämie IPostC mit 8x20sec. bzw. 4x60sec. durchgeführt (Kontrolle und Interventionen je n=8). Die LDH wurde im Perfusat bestimmt (wie unter 3.5 beschrieben) und ist als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$  geben die Signifikanzen an (Two Sample Student's t-test). Es sind Gesamt-LDH (**A**) und frühe (**B**) und späte (**C**) Phase der LDH abgebildet.

Der Gallefluss wird im Gesamtwert (**Bild 4.6A**) für beide Lebermodelle und Interventionen gesteigert, signifikant jedoch nur für gesund mit IPostC 4x60sec. In der frühen Phase (**Bild 4.6B**) der Reperfusion sehen wir ebenfalls eine Steigerung des Galleflusses, aber auch hier ist diese nur für gesunde Lebern mit der Intervention 4x60sec. signifikant. Die späte Phase (**Bild 4.6C**) dagegen zeigt in beiden Modellen der Leber und sowohl mit 8x20sec. als auch 4x60sec. eine signifikante Erhöhung des Galleflusses.

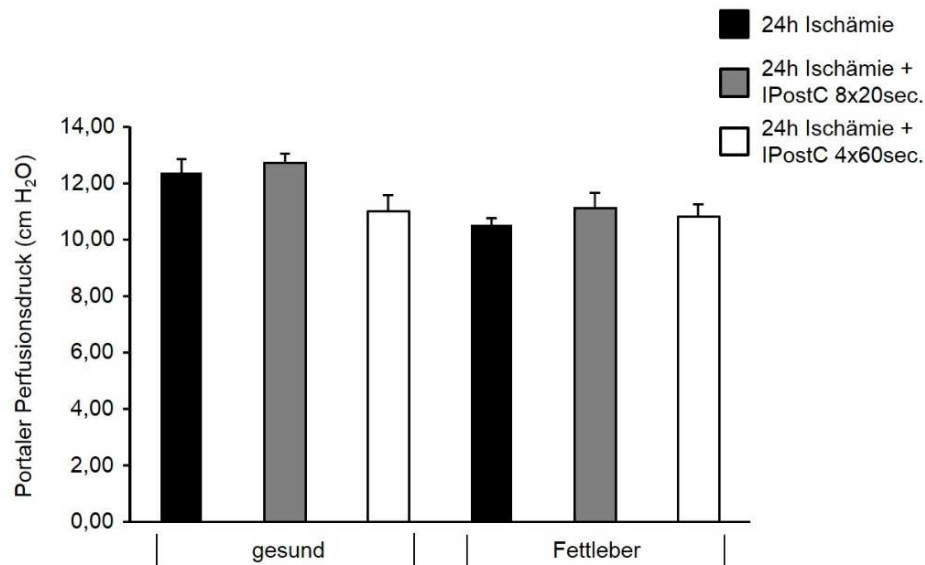
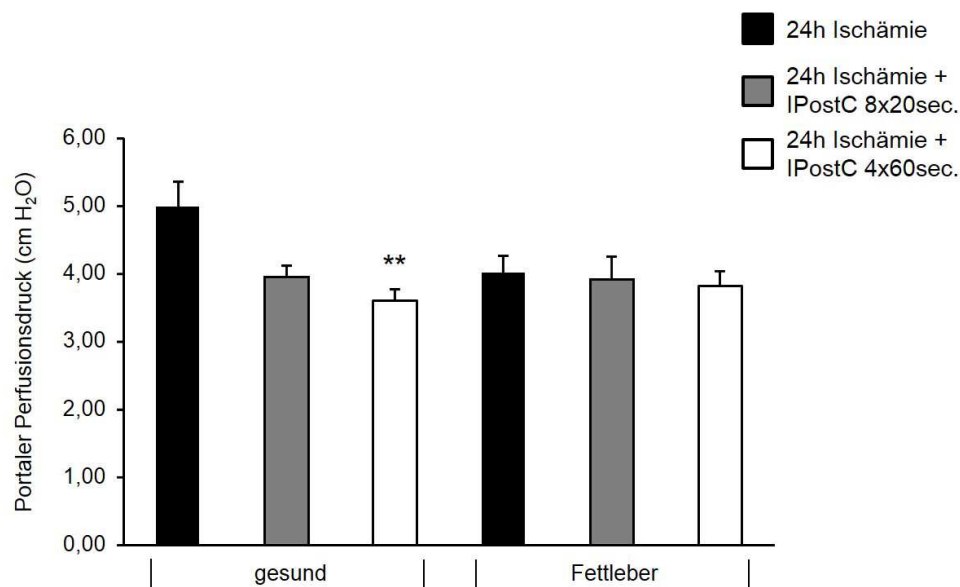
**A**

**B****C****Bild 4.6: Gallefluss nach kalter Ischämie in situ  $\pm$  IPostC**

Nach 30-minütiger Anperfusion von gesunden und Fettlebern wurden diese 24h bei 4°C gelagert und dann erneut perfundiert. Für die Interventionsgruppen erfolgte direkt nach der Ischämie eine IPostC mit 8x20sec. bzw. 4x60sec. (Kontrolle und Interventionen je n=8). Die Galle wurde über den gesamten Zeitraum der Reperfusion gesammelt und gewogen. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben und \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$  zeigen die Signifikanzen (Two Sample Student's t-test). Es sind Gesamt-Gallefluss (**A**) und frühe (**B**) und späte (**C**) Phase des Galleflusses dargestellt.

Der maximale portale Perfusionsdruck (**Bild 4.7A**) konnte weder für die gesunde Leber noch in der Fettleber durch IPostC vermindert werden.

Am Ende der Perfusion (**Bild 4.7B**) konnte der portale Perfusionsdruck für die gesunde Leber mithilfe der IPostC gesenkt werden, mit IPostC 4x60sec. sogar deutlich. Für die Fettleber dagegen zeigt sich kein Effekt.

**A****B**



**Bild 4.7: Portaler Perfusionsdruck nach kalter Ischämie *in situ* ± IPostC**

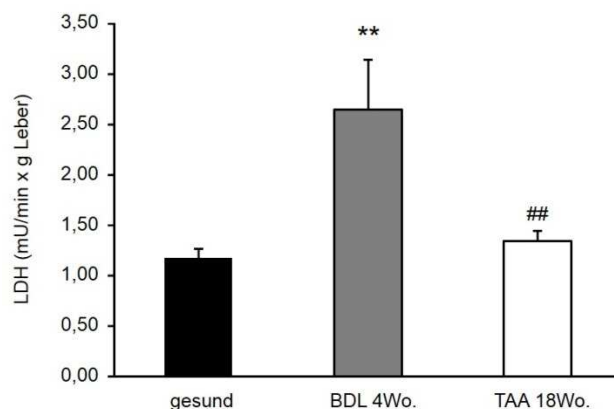
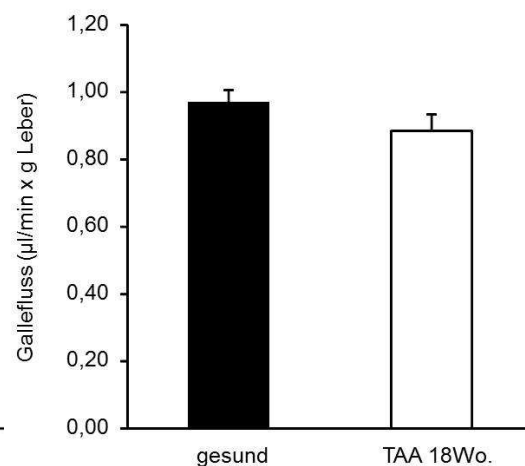
Nach 30min. Anperfusion und 24h Ischämie bei 4°C, erfolgten 120min. Reperfusion. Für die Interventionsgruppen 8x20sec. und 4x60sec. wurde IPostC im Anschluss an die Ischämie durchgeführt (Kontrolle und Interventionen je n=8). Der portale Perfusionsdruck wurde über die gesamte Zeit der Reperfusion an einer Wassersäule abgelesen und ist als Mittelwert ± SEM angegeben. \*\*p<0,01 gibt die Signifikanz (Two Sample Student's t-test) an. Es sind der maximale portale Perfusionsdruck (**A**) und der Enddruck (**B**) abgebildet.

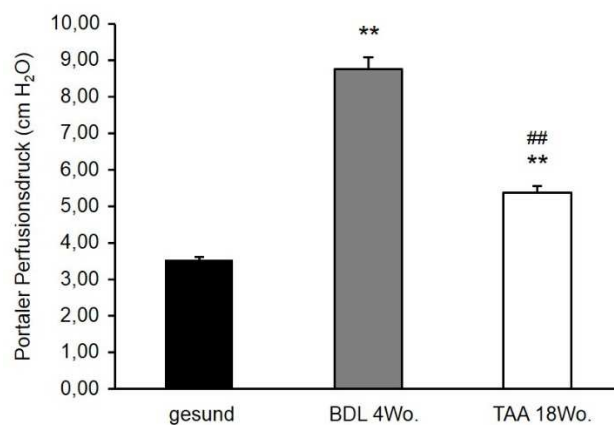
**4.2.2 Warme Ischämie *in situ* ± IPostC**

Für die warme Ischämie *in situ* wurden drei verschiedene Lebermodelle verwendet: gesund, Leberfibrose (BDL 4Wo.) und Leberzirrhose (TAA 18Wo.).

Die Basalwerte für LDH, Gallefluss und portalen Perfusionsdruck nach 30min. Anperfusion sind im **Bild 4.8** angegeben.

Es ist zu erkennen, dass die BDL 4Wo.-Lebern einen deutlich höheren Ausgangswert als gesund und TAA 18Wo. für die LDH (**Bild 4.8A**) und auch für den portalen Perfusionsdruck (**Bild 4.8C**) aufweisen. Aber auch TAA 18Wo. zeigt im Vergleich zu gesunden Lebern einen hohen Basalwert für den portalen Perfusionsdruck (**Bild 4.8C**). Die Basalwerte für den Gallefluss verhalten sich für gesund und TAA 18Wo. annähernd gleich (**Bild 4.8B**). Für BDL 4Wo. können keine Angaben zum Gallefluss gemacht werden, da der Gallengang vier Wochen zuvor ligiert wurde und somit während der Perfusion keine Galle mehr aufgefangen werden konnte.

**A****B**

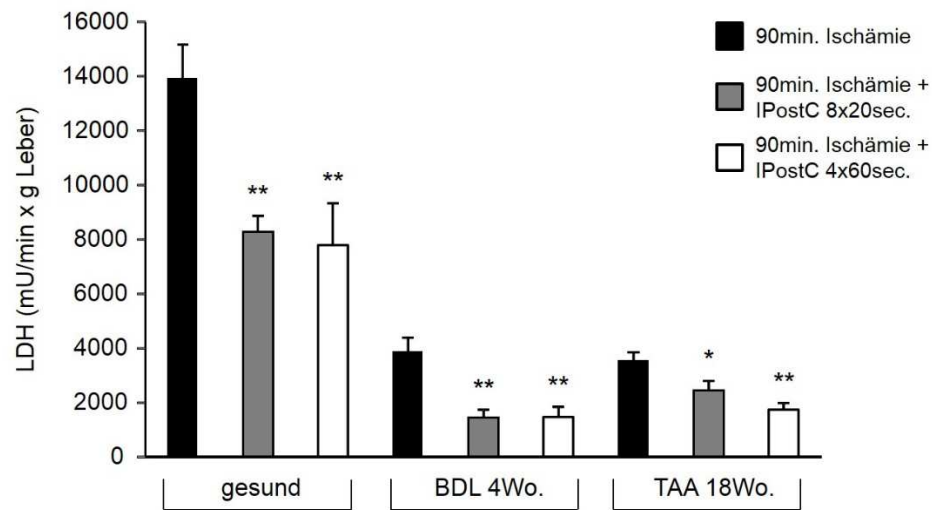
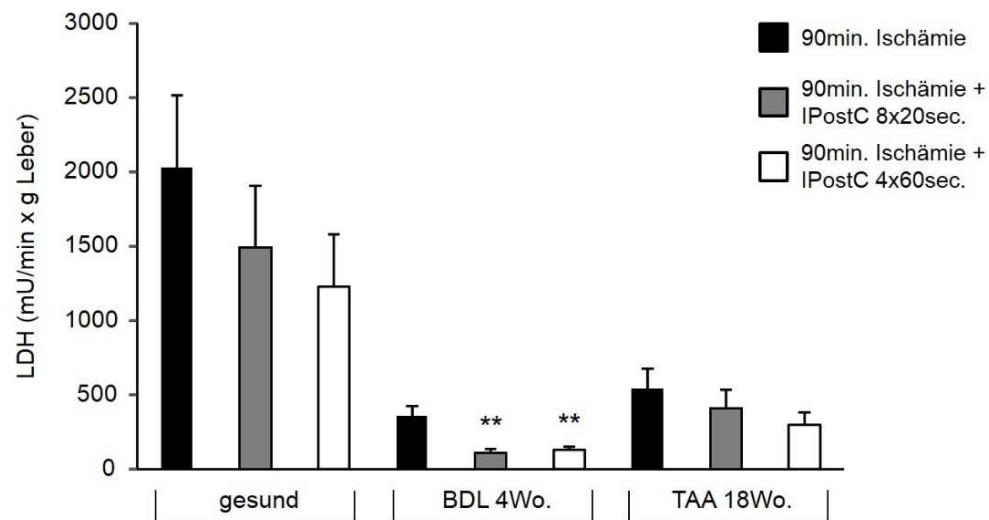
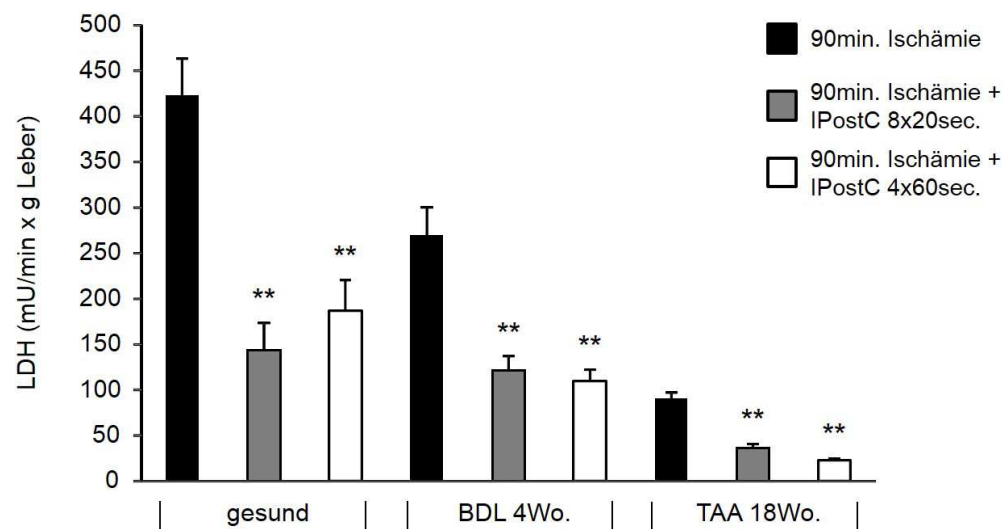
**C**

**Bild 4.8: Basalwerte von LDH (A), Gallefluss (B) und portalem Perfusionsdruck (C)**

Die Lebern wurden 30min. perfundiert. LDH wurde im Perfusat bestimmt (wie unter 3.5 beschrieben), die Galle gesammelt und gewogen und der portale Perfusionsdruck an der Wassersäule abgelesen. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (je  $n=24$ ) angegeben und  $**p<0,01$  (BDL 4Wo. und TAA 18Wo. zu gesund) und  $##p<0,01$  (TAA 18Wo. zu BDL 4Wo.) geben die Signifikanzen (Two Sample Student's t-test) an.

Der Gesamtwert für die LDH (**Bild 4.9A**) konnte nach Ischämie und Reperfusion mithilfe der IPostC in allen drei Lebermodellen und mit beiden Interventionen deutlich gesenkt werden.

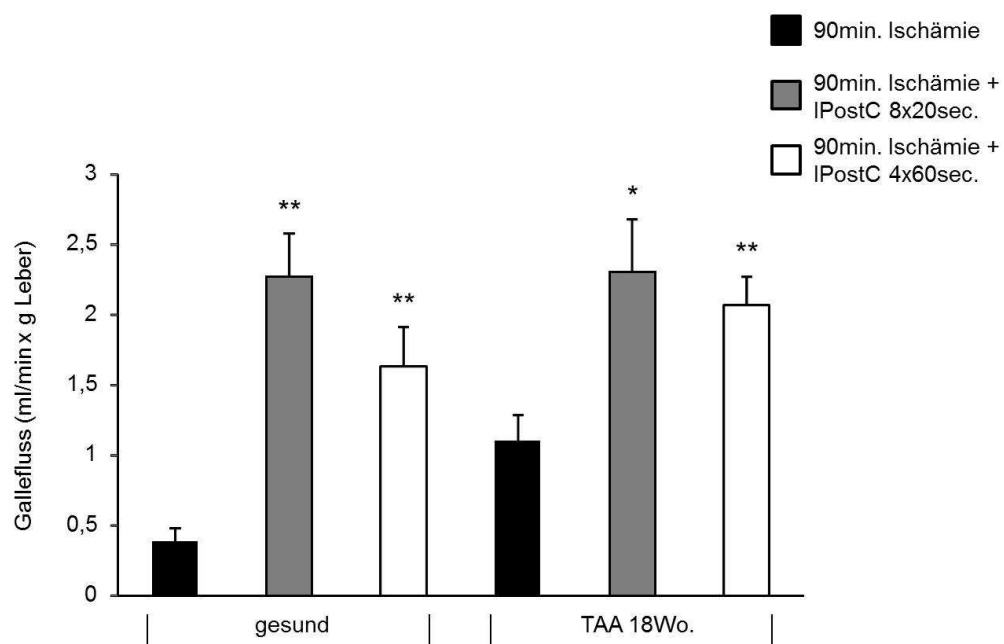
In der frühen Phase (**Bild 4.9B**) der Reperfusion konnte die LDH ebenfalls für gesund, BDL 4Wo. und TAA 18Wo. mit 8x20sec. und 4x60sec. reduziert werden. Jedoch nur für BDL 4Wo. war diese Reduktion auch signifikant. In der späten Phase (**Bild 4.9C**) der Reperfusion dagegen sehen wir erneut für alle Modelle der Leber und jeweils beide Gruppen der IPostC eine sehr starke Verminderung der LDH.

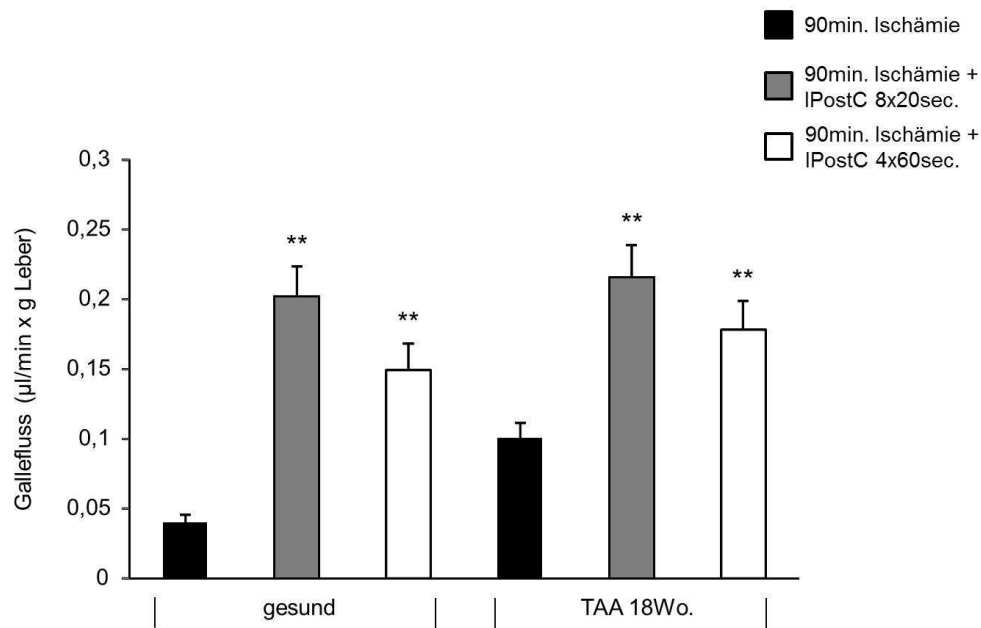
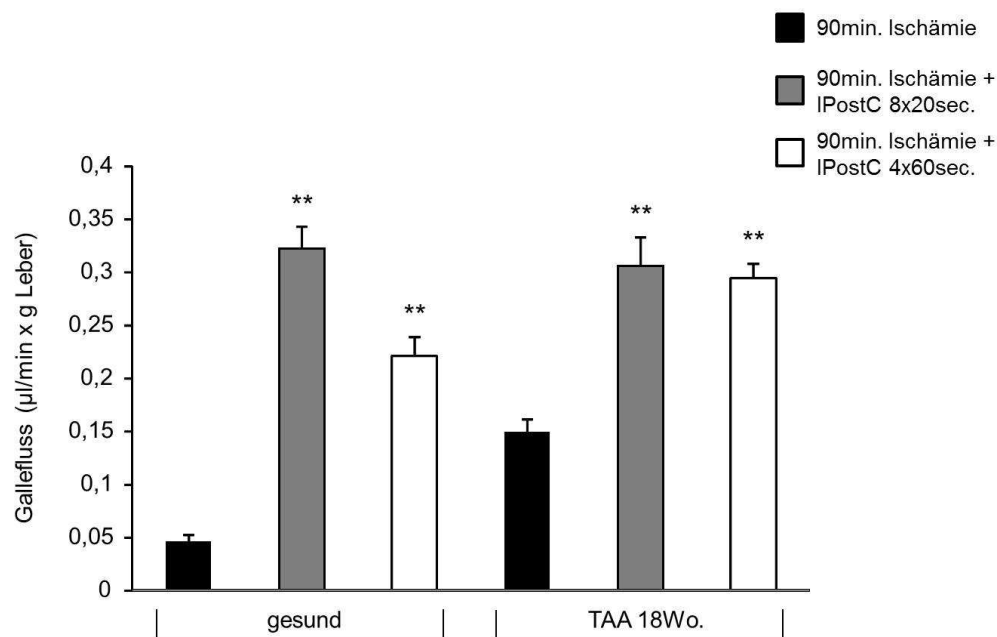
**A****B****C**

**Bild 4.9: LDH nach warmer Ischämie in situ ± IPostC**

Die Lebern wurden 30min. anperfundiert, anschließend 90min. bei 37°C gelagert und dann 90min. reperfundiert. Die Interventionen der IPostC mit 8x20sec. und 4x60sec. erfolgten direkt nach der Ischämie (Kontrolle und Interventionen je n=8). Die LDH wurde im Perfusat gemessen (wie unter 3.5 beschrieben) und ist als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$  kennzeichnen die Signifikanzen (Two Sample Student's t-test). Es sind Gesamt-LDH (**A**) und frühe (**B**) und späte (**C**) Phase der LDH angegeben.

Der Gallefluss konnte im Gesamtwert (**Bild 4.10A**) mithilfe der IPostC in allen drei Lebermodellen und auch jeweils mit beiden Interventionen deutlich gesteigert werden. Auch für die frühe (**Bild 4.10B**) und späte Phase (**Bild 4.10C**) der Reperfusion zeigt sich sowohl mit 8x20sec. als auch mit 4x60sec. für gesund, BDL 4Wo. und TAA 18Wo. eine signifikante Erhöhung des Galleflusses.

**A**

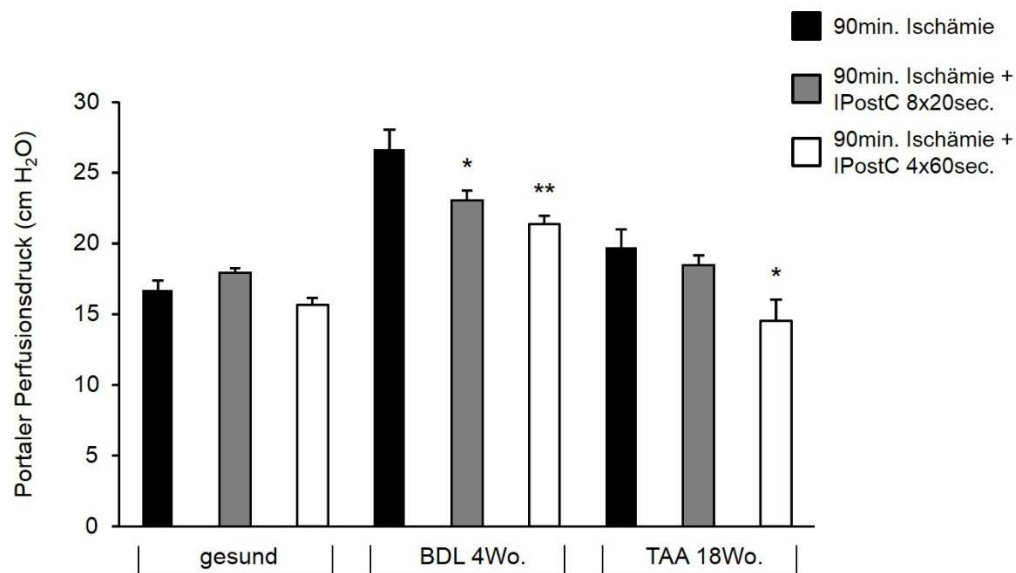
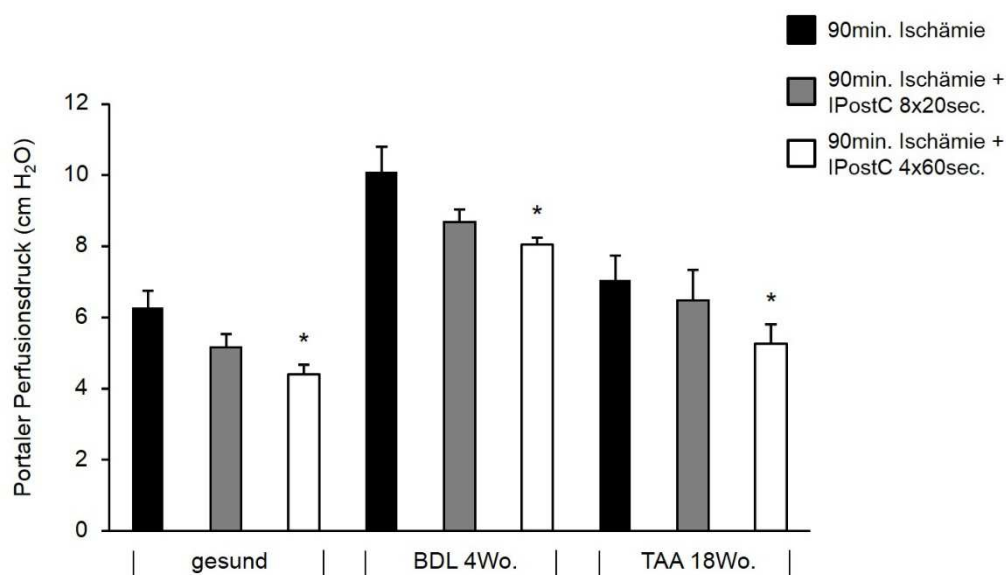
**B****C**

**Bild 4.10: Gallefluss nach warmer Ischämie in situ ± IPostC**

Nach 30min. Anperfusion wurden die Lebern 90min. bei 37°C gelagert und anschließend erfolgte eine 90-minütige Reperfusion. Die IPostC wurde mit 8x20sec. bzw. 4x60sec. direkt im Anschluss an die Ischämie durchgeführt (Kontrolle und Interventionen je n=8). Die Galle wurde über die gesamte Reperfusionszeit gesammelt und gewogen. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben und \*p<0,05 und \*\*p<0,01 geben die Signifikanzen an (Two Sample Student's t-test). Abgebildet sind Gesamt-Gallefluss (**A**) und frühe (**B**) und späte (**C**) Phase des Galleflusses.

Der maximale portale Perfusionsdruck (**Bild 4.11A**) verhält sich sehr unterschiedlich für die einzelnen Lebermodelle. Für die gesunde Leber ergibt sich kein Effekt durch IPostC. Bei BDL 4Wo. dagegen konnte der maximale portale Perfusionsdruck mit beiden Interventionsgruppen deutlich gesenkt werden. Für TAA 18Wo. sehen wir ebenfalls mit beiden Interventionen der IPostC eine Verminderung des maximalen Druckes, die nur mit 4x60sec. signifikant ist.

Am Ende der Perfusion (**Bild 4.11B**) verhält sich der portale Perfusionsdruck in den drei Lebermodellen sehr ähnlich. Er konnte jeweils sowohl mit 8x20sec. als auch mit 4x60sec. reduziert werden, wobei nur die Reduktion mit 4x60sec. jeweils signifikant ist.

**A****B**

**Bild 4.11: Portaler Perfusionsdruck nach warmer Ischämie *in situ* ± IPostC**

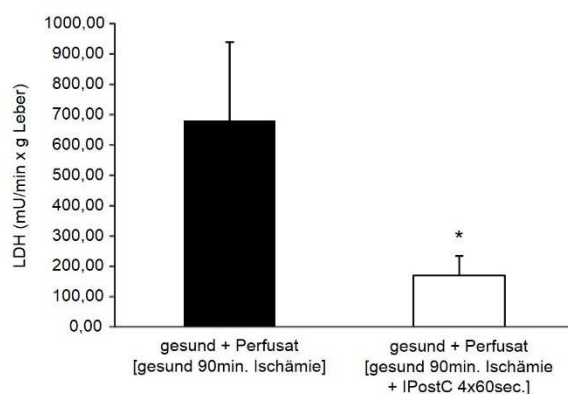
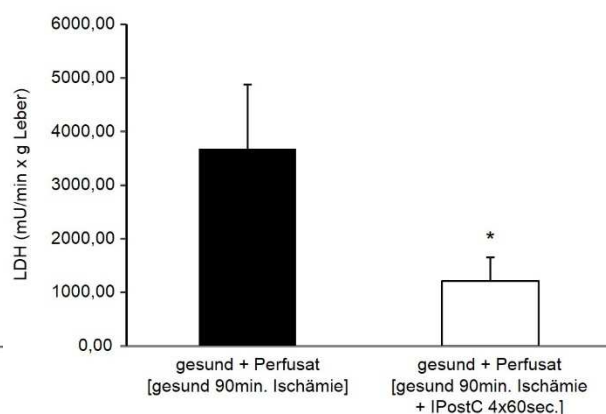
Nach einer 30-minütigen Anperfusion und 90min. Ischämie bei 37°C, wurden die Lebern 90min. reperfundiert. Es erfolgte eine IPostC mit 8x20sec. und 4x60sec. direkt nach der warmen Ischämie (Kontrolle und Interventionen je n=8). Die portale Perfusionszeit wurde über die gesamte Reperfusionzeit an der Wassersäule abgelesen und ist als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Signifikanzen (Two Sample Student's t-test) sind mit \*p<0,05 und \*\*p<0,01 angegeben. Abgebildet sind der maximale portale Perfusionsdruck (**A**) und der Enddruck (**B**).

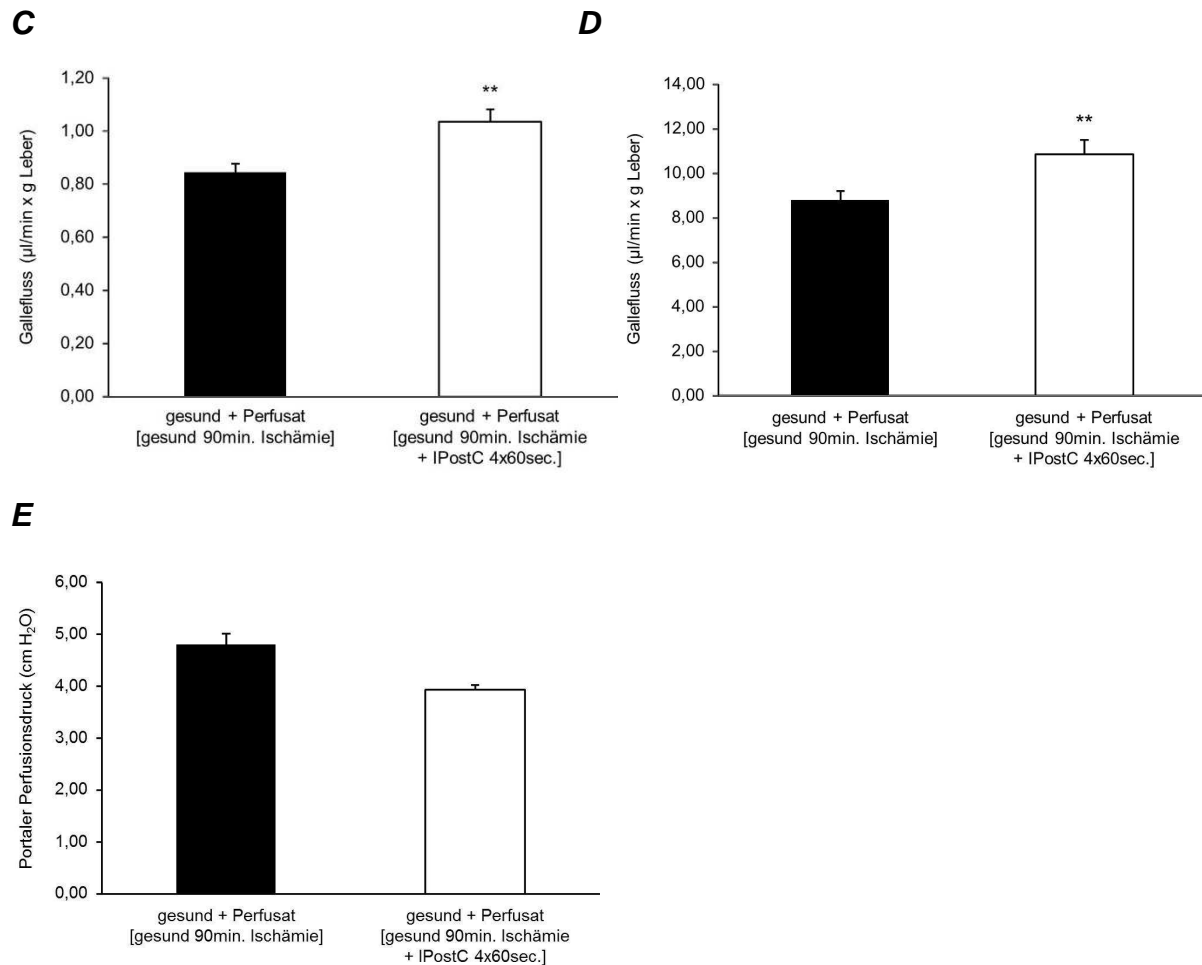
**4.2.3 „Folgeperfusionen“ nach warmer Ischämie *in situ* ± IPostC**

Zur Aufarbeitung der Ergebnisse zu LDH, Gallefluss und portalem Perfusionsdruck aus den Perfusionen wurden „Folgeperfusionen“ durchgeführt. Dazu wurde eine gesunde Leber einer 90-minütigen warmen Ischämie ausgesetzt und anschließend mit und ohne IPostC mit 4x60sec. reperfundiert. Das Perfusat der gesamten Reperfusion wurde gesammelt und in die Perfusion einer zweiten gesunden Leber eingebracht (wie unter 3.1.6 beschrieben). Angegeben sind hier nur die Ergebnisse der „Folgeperfusionen“.

Die maximale LDH (**Bild 4.12A**) und auch die Gesamt-LDH (**Bild 4.12B**) ist bei den „Folgeperfusionen“, bei denen Perfusat von IPostC (4x60sec.)-Versuchen (postkonditioniertes Perfusat) verwendet wurde, deutlich niedriger.

Der Gallefluss konnte im Maximalwert (**Bild 4.12C**) und im Gesamtwert (**Bild 4.12D**) für die „Folgeperfusionen“ mit postkonditioniertem Perfusat deutlich gesteigert werden. Der maximale portale Perfusionsdruck (**Bild 4.12E**) ist annähernd gleich für „Folgeperfusionen“ mit postkonditioniertem und nicht-postkonditioniertem Perfusat.

**A****B**



**Bild 4.12: LDH, Gallefluss und portaler Perfusionsdruck bei „Folgeperfusionen“ nach warmer Ischämie in situ ± IPostC**

Gesunde Lebern wurden einer 90min. Ischämie bei 37°C und anschließender 90-minütiger Reperfusion (± IPostC 4x60sec.) unterzogen. Das Perfusat der Reperfusion wurde komplett gesammelt, um damit eine weitere gesunde Leber über 30min. zu perfundieren (Kontrolle und Intervention je n=6). LDH wurde im Perfusat bestimmt (wie unter 3.5 beschrieben), Galle gesammelt und gewogen und der portale Perfusionsdruck an der Wassersäule abgelesen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, \*p<0,05 und \*\*p<0,01 geben die Signifikanzen (Two Sample Student's t-test) an. Es sind maximale LDH (**A**) und Gesamt-LDH (**B**), maximaler Gallefluss (**C**) und Gesamt-Gallefluss (**D**) und maximaler portaler Perfusionsdruck (**E**) abgebildet.



### 4.3 Thromboxan B<sub>2</sub> nach IPostC

Zur genaueren Beurteilung der Mikrozirkulation während und nach der Reperfusion wurde das TXB<sub>2</sub> als inaktiver Metabolit des Vasokonstriktors Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) gemessen.

Ermittelt wurden für kalte und warme Ischämie *in situ* das Gesamt-TXB<sub>2</sub>, wobei „Gesamt“ wie bei der LDH die Addition von Messwerten an TXB<sub>2</sub> im Perfusat, welches zu definierten Zeitpunkten der Reperfusion (Minute 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 und 120 bei kalter Ischämie; Minute 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 und 90 bei warmer Ischämie) abgenommen wurde, umfasst.

Außerdem wurde das TXB<sub>2</sub> in der frühen (0-60min. bei kalter Ischämie; 0-40min. bei warmer Ischämie) und späten Phase (70-120min. bei kalter Ischämie; 50-90min. bei warmer Ischämie) der Reperfusion untersucht.

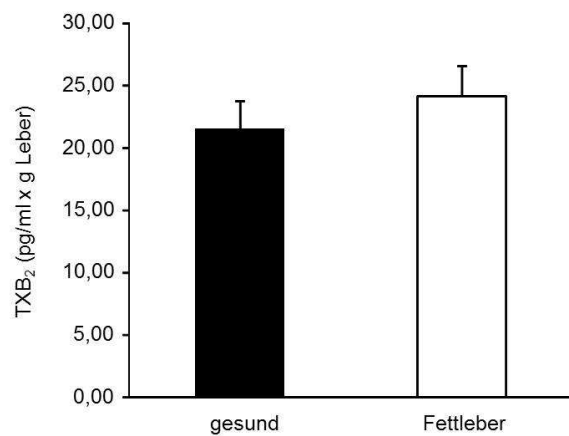
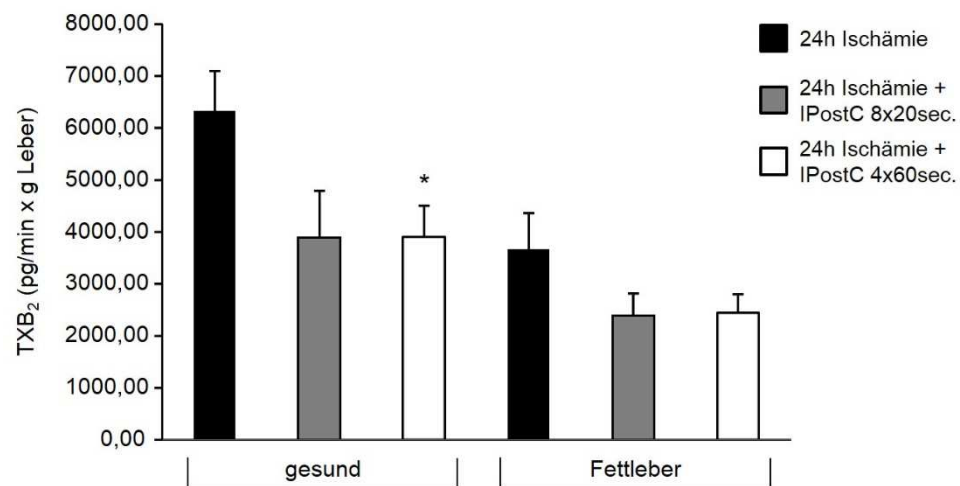
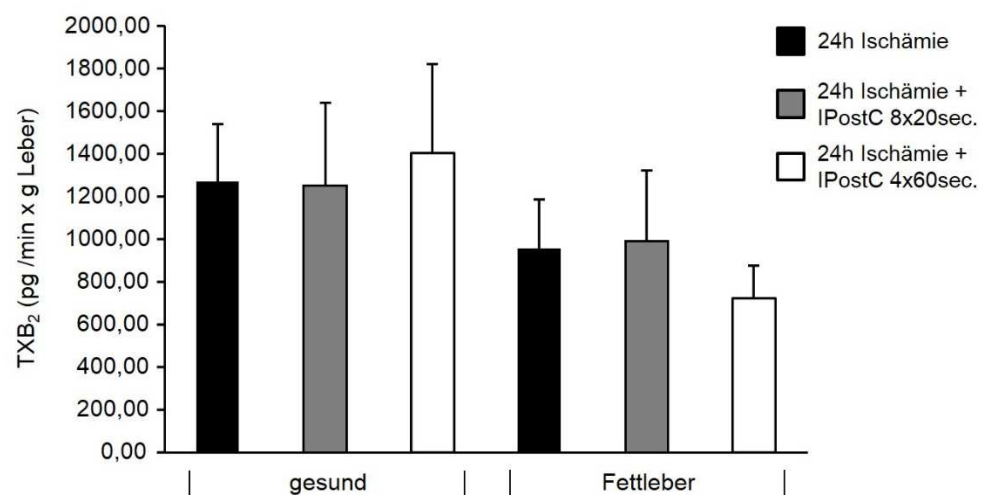
Die Basalwerte der einzelnen Lebermodelle in der Anperfusion sind ebenfalls dargestellt.

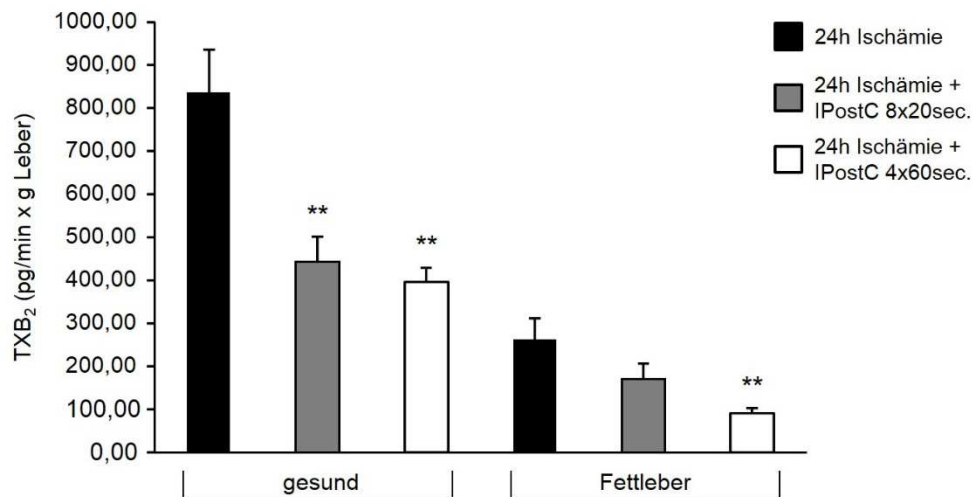
#### 4.3.1 Kalte Ischämie *in situ* ± IPostC

Die Basalwerte des TXB<sub>2</sub> sind für gesunde Lebern und für Fettlebern nahezu gleich (**Bild 4.13A**).

Der Gesamtwert (**Bild 4.13B**) an TXB<sub>2</sub> ist in beiden Lebermodellen nach IPostC reduziert, signifikant jedoch nur für die gesunde Leber mit der Intervention 4x60sec.

In der frühen Phase (**Bild 4.13C**) der Reperfusion ist kein Effekt durch IPostC zu sehen. Die späte Phase (**Bild 4.13D**) zeigt eine deutliche Senkung des TXB<sub>2</sub> in beiden Lebermodellen und auch mit beiden Interventionsgruppen.

**A****B****C**

**D**

**Bild 4.13: TXB<sub>2</sub> Basalwerte und nach kalter Ischämie *in situ* ± IPostC**

Die Lebern wurden 30min. anperfundiert, 24h bei 4°C gelagert und anschließend 120min. reperfundiert. Direkt nach der Ischämie wurde für die Interventionsgruppen die IPostC mit 8x20sec. bzw. 4x60sec. durchgeführt (Kontrolle und Interventionen je n=8). Das TXB<sub>2</sub> wurde im Perfusat gemessen (wie unter 3.6.1 beschrieben) und ist als Mittelwert ± SEM dargestellt. \*p<0,05 und \*\*p<0,01 geben die Signifikanzen (Two Sample Student's t-test) an. Abgebildet sind die Basalwerte (**A**), das Gesamt-TXB<sub>2</sub> (**B**) sowie die frühe (**C**) und die späte (**D**) Phase des TXB<sub>2</sub>.

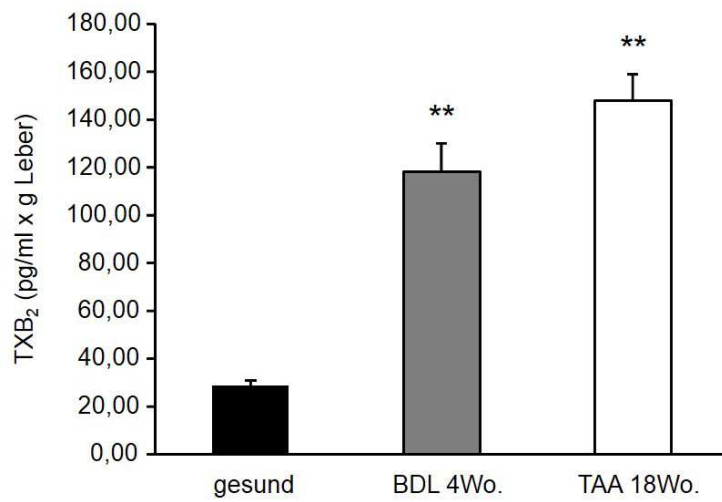
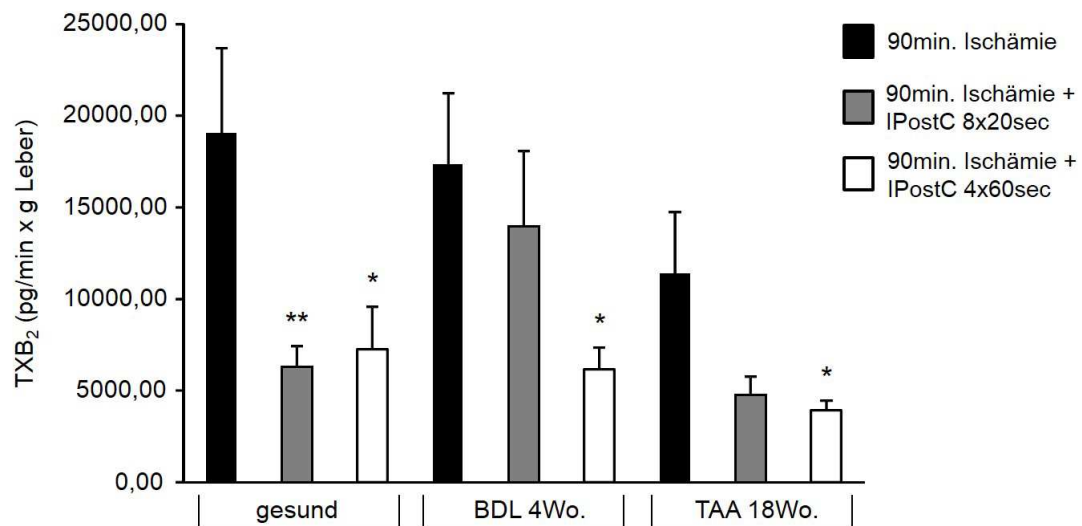
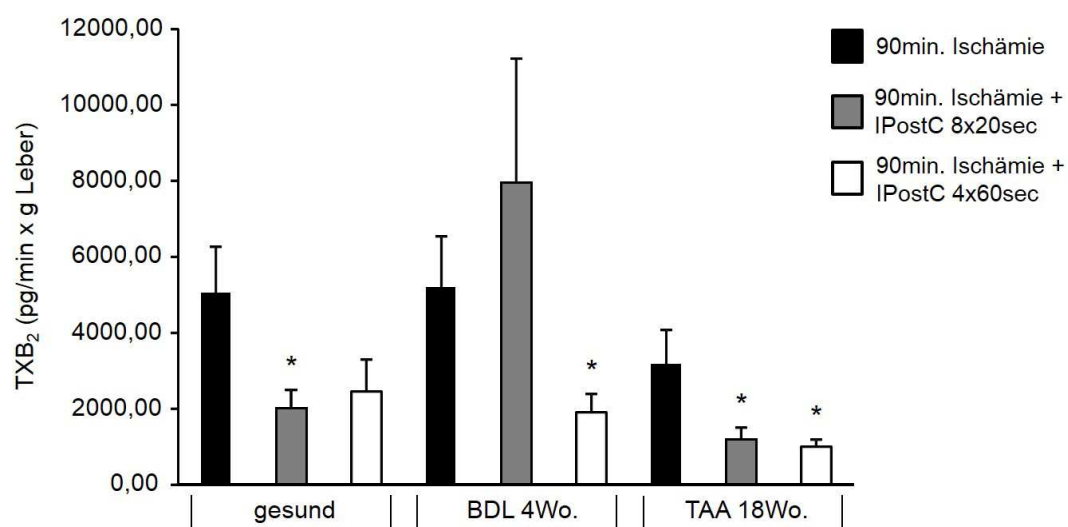
#### 4.3.2 Warme Ischämie *in situ* ± IPostC

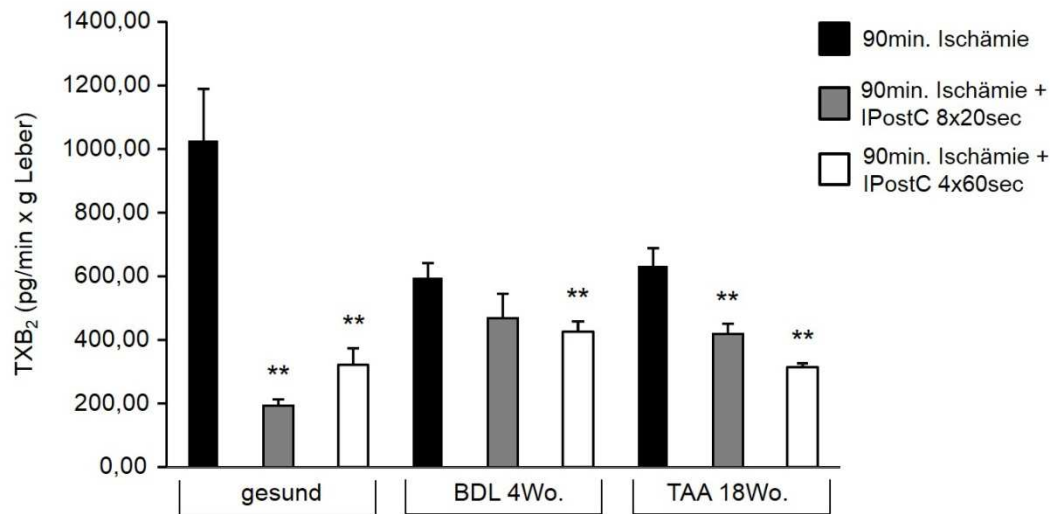
Die Basalwerte an TXB<sub>2</sub> (**Bild 4.14A**) für BDL 4Wo. und TAA 18Wo. sind deutlich erhöht gegenüber den gesunden Lebern.

Das Gesamt-TXB<sub>2</sub> (**Bild 4.14B**) ist in den gesunden Lebern mit beiden Interventionen signifikant reduziert. Bei BDL 4Wo. und TAA 18Wo. sehen wir ebenfalls nach IPostC eine Reduktion des TXB<sub>2</sub>, welche jedoch jeweils nur mit 4x60sec. signifikant ist.

In der frühen Phase (**Bild 4.14C**) der Reperfusion verhalten sich die drei Lebermodelle sehr unterschiedlich in Bezug auf das TXB<sub>2</sub>. Für gesund zeigt sich mit IPostC 8x20sec. eine signifikante Senkung, für BDL 4Wo. nur mit IPostC 4x60sec.. Bei TAA 18Wo. ist das TXB<sub>2</sub> mit beiden Interventionsgruppen signifikant gesenkt.

In der späten Phase (**Bild 4.14D**) ist für gesund und TAA 18Wo. sowohl mit 8x20sec. als auch mit 4x60sec. eine deutliche Reduktion des TXB<sub>2</sub> zu erkennen. Für BDL 4Wo. ist die Reduktion von TXB<sub>2</sub> nur mit der Intervention 4x60sec. signifikant.

**A****B****C**

**D**

**Bild 4.14: TXB<sub>2</sub> Basalwerte und nach warmer Ischämie in situ ± IPostC**

Nach 30min. Anperfusion wurden die Lebern 90min. bei 37°C gelagert, um dann weitere 90min. reperfundiert zu werden. Die Interventionen der IPostC mit 8x20sec. und 4x60sec. erfolgten im Anschluss an die Ischämie (Kontrolle und Interventionen je n=8). TXB<sub>2</sub> wurde im Perfusat gemessen (wie unter 3.6.1 beschrieben) und als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Signifikanzen (Two Sample Student's t-test) sind mit \*p<0,05 und \*\*p<0,01 gekennzeichnet. Es sind die Basalwerte (**A**), Gesamt-TXB<sub>2</sub> (**B**) und die frühe (**C**) und die späte (**D**) Phase von TXB<sub>2</sub> dargestellt.

## 4.4 Parameter im Serum nach warmer Ischämie *in vivo* ± IPostC

Im Anschluss an die *in vivo*-Versuche zur warmen Ischämie ± IPostC wurde den Tieren venöses Blut abgenommen, um daraus Serum zu gewinnen (wie unter 3.7.1 beschrieben) und klinisch-chemische Parameter sowie Zytokine zu bestimmen.

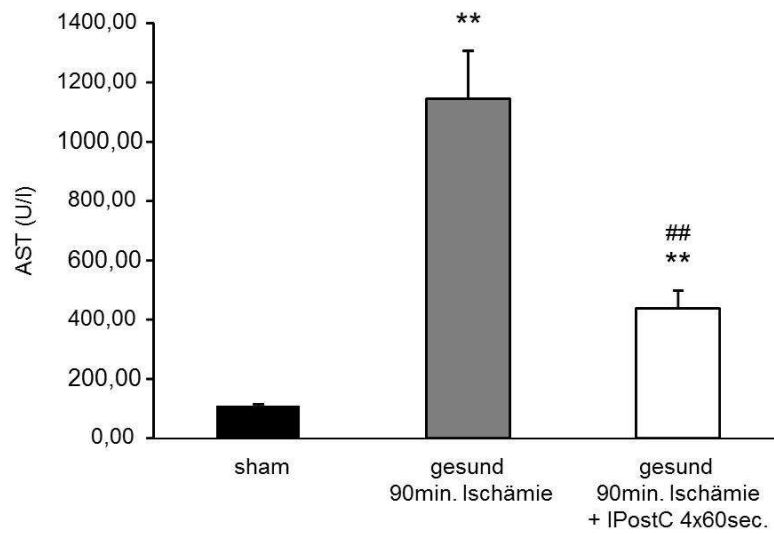
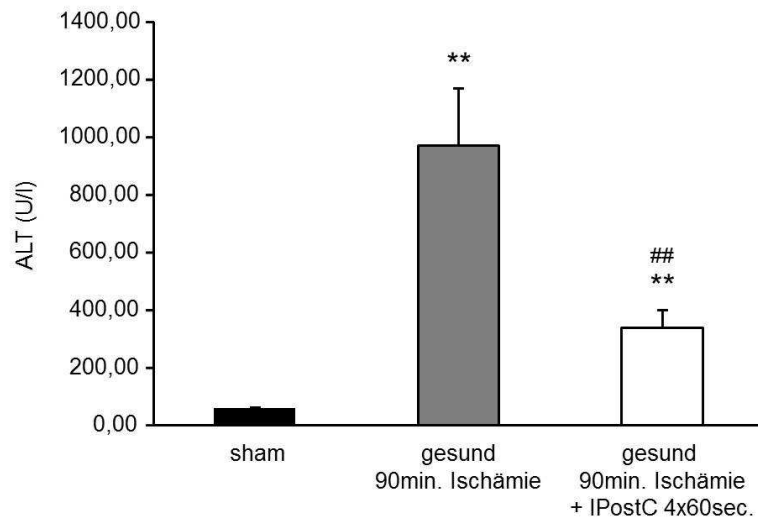
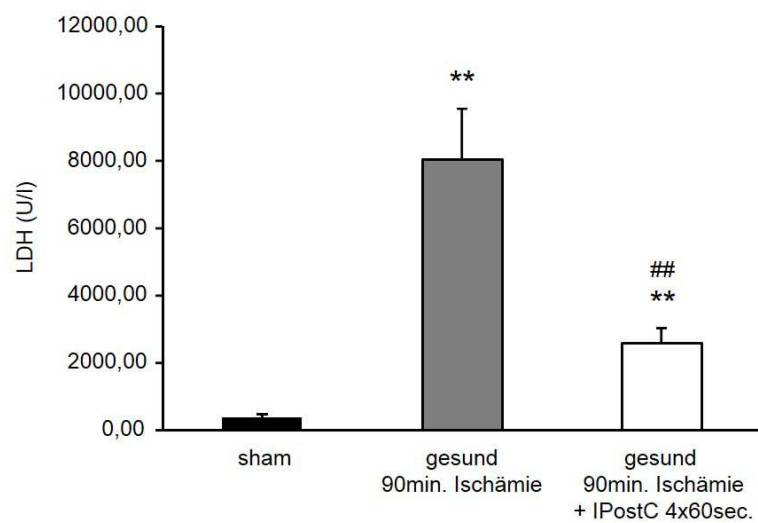
Zunächst wurden die beiden wichtigen Transaminasen der Leber, die Aspartat-Aminotransferase (AST) und die Alanin-Aminotransferase (ALT), sowie die Laktatdehydrogenase (LDH) als Indikator für den Zellschaden, in der klinischen Chemie gemessen. Die Mengen der Enzyme sind jeweils in U/l Serum angegeben.

Des Weiteren wurden zur Erhebung des Zytokinstatus im Blut der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und das Interleukin 6 (IL 6) im Serum mit einem ELISA (wie unter 3.6.2 und 3.6.3 beschrieben) gemessen. Die Werte für TNF $\alpha$  und IL 6 sind jeweils in pg/ml Serum aufgeführt.

Für alle Parameter im Blut sind die Signifikanzen der Versuchsgruppen 90min. Ischämie und Ischämie + IPostC 4x60sec. im Vergleich zur sham-Gruppe angegeben. Zusätzlich wurde die Interventionsgruppe 4x60sec. mit der Versuchsgruppe 90min. Ischämie verglichen und auch dafür sind die Signifikanzen dargestellt.

### 4.4.1 Transaminasen und Laktatdehydrogenase

Die drei Enzyme verhalten sich nach den *in vivo*-Versuchen sehr ähnlich (**Bild 4.15**). Es ist eine deutliche Steigerung von der sham-Gruppe zu 90min. Ischämie zu sehen. Auch zwischen sham und der Intervention IPostC 4x60sec. besteht eine signifikante Erhöhung von AST (**Bild 4.15A**), ALT (**Bild 4.15B**) und LDH (**Bild 4.15C**). Im Vergleich zu 90min. Ischämie sind die Enzyme nach der IPostC mit 4x60sec. deutlich gesenkt.

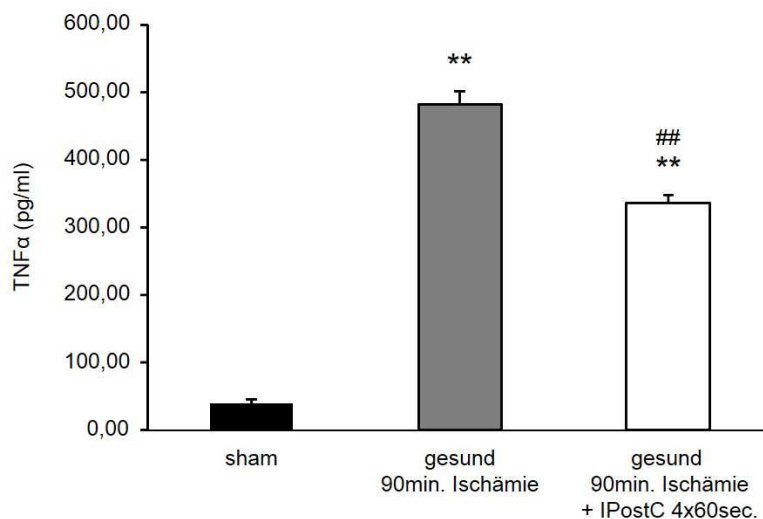
**A****B****C**

**Bild 4.15: AST (A), ALT (B) und LDH (C) nach warmer Ischämie in vivo ± IPostC**

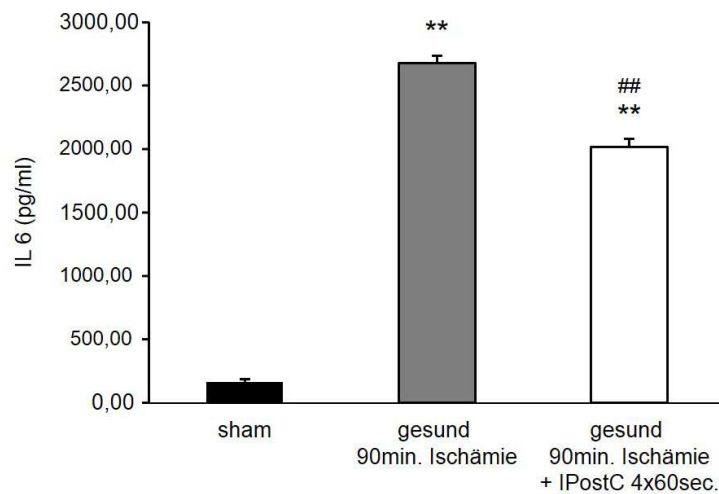
Die Lebern wurden einer partiellen 90-minütigen Ischämie bei 37°C und anschließend 90min. Reperfusion ausgesetzt bzw. für sham 90+90min. Perfusion ausgesetzt. Die IPostC mit 4x60sec. erfolgte direkt im Anschluss an die Ischämie (sham, Kontrolle und Intervention je n=8). AST, ALT und LDH wurden im Serum gemessen (wie unter 3.7 beschrieben) und die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*p<0,01 (Kontrolle und Intervention zu sham) und ##p<0,01 (Intervention zu Kontrolle) geben die Signifikanzen (Two Sample Student's t-test) an.

**4.4.2 Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und Interleukin 6**

Für TNF $\alpha$  (**Bild 4.16A**) und IL 6 (**Bild 4.16B**) ist nach 90min. warmer Ischämie eine deutliche Steigerung gegenüber der sham-Gruppe zu erkennen. Nach der Intervention IPostC 4x60sec. wurden die Werte für die beiden Zytokine wieder signifikant gesenkt, im Vergleich zu sham waren sie jedoch weiterhin stark erhöht (**Bild 4.16**).

**A**



**B**

**Bild 4.16:  $TNF\alpha$  (A) und IL 6 (B) nach warmer Ischämie in vivo  $\pm$  IPostC**

Nach 90min. partieller warmer Ischämie folgten 90min. Reperfusion. Bei sham erfolgten 90+90min. Perfusion. Direkt nach der Ischämiephase wurde die Intervention IPostC mit 4x60sec. durchgeführt (sham, Kontrolle und Intervention je n=8).  $TNF\alpha$  und IL 6 wurden im Serum per ELISA (wie unter 3.6.2 und 3.6.3 beschrieben) gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben und  $**p<0,01$  (Kontrolle und Intervention zu sham) und  $##p<0,01$  (Intervention zu Kontrolle) zeigen die Signifikanzen (Two Sample Student's t-test) an.

## 4.5 Genexpressionen nach IPostC

Zur Darstellung möglicher Mechanismen der IPostC wurden sowohl für die Perfusionen zu kalter und warmer Ischämie als auch zum *in vivo* Modell zur warmen Ischämie die Expressionen von acht verschiedenen Genen (**Tabelle 4.4**) untersucht. *Actb* und *B2m* dienten dabei als sogenannte Housekeeping Gene, die in nahezu allen Zellen exprimiert werden und daher zur Normierung der Zielgene dienen.

Für die *in situ* Perfusionen wurden die Expressionen der Interventionsgruppen 8x20sec. und 4x60sec. in allen Lebermodellen jeweils mit der Kontrollgruppe (24h Ischämie bei 4°C für die kalte Ischämie und 90min. Ischämie bei 37°C für die warme Ischämie) verglichen und als x-fache Veränderung berechnet.

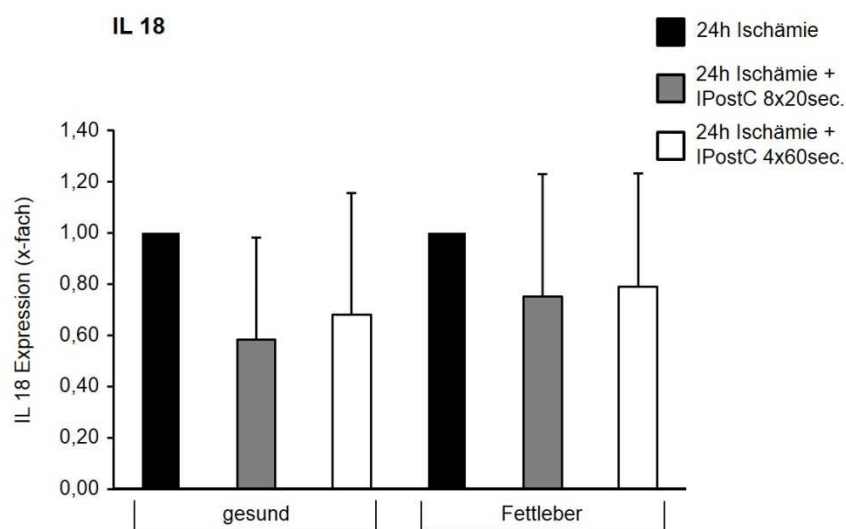
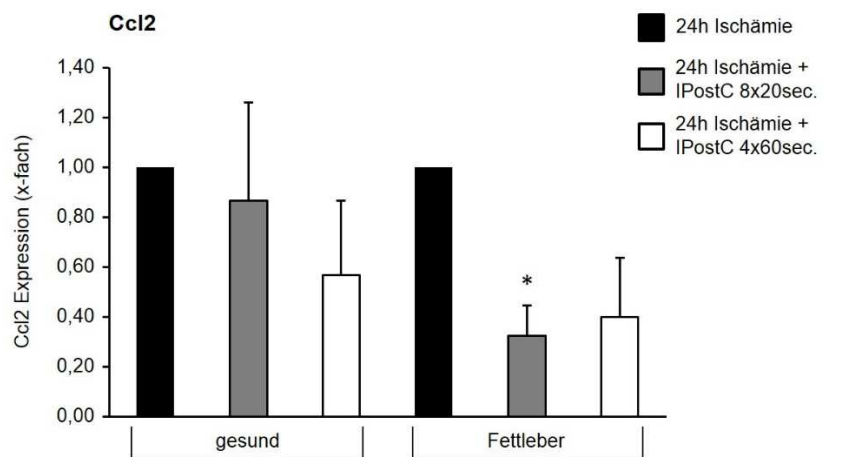
Bei den *in vivo*-Versuchen sind die Versuchsgruppen zur 90-minütigen warmen Ischämie und zur Intervention der IPostC mit 4x60sec. jeweils als x-fache Veränderung zur sham-Gruppe dargestellt. Zusätzlich sind auch signifikante Veränderungen der Interventionsgruppe mit 4x60sec. im Vergleich zur Versuchsgruppe 90min. Ischämie angegeben.

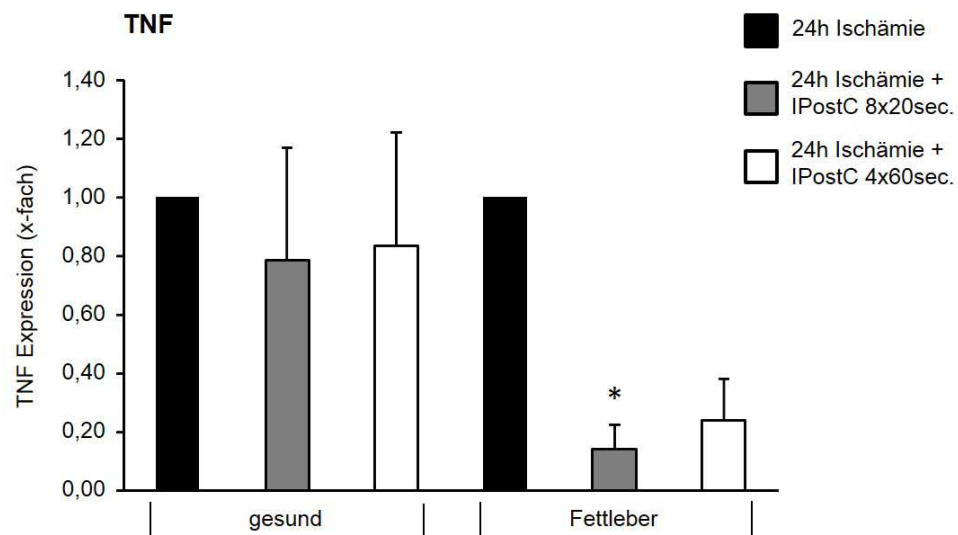
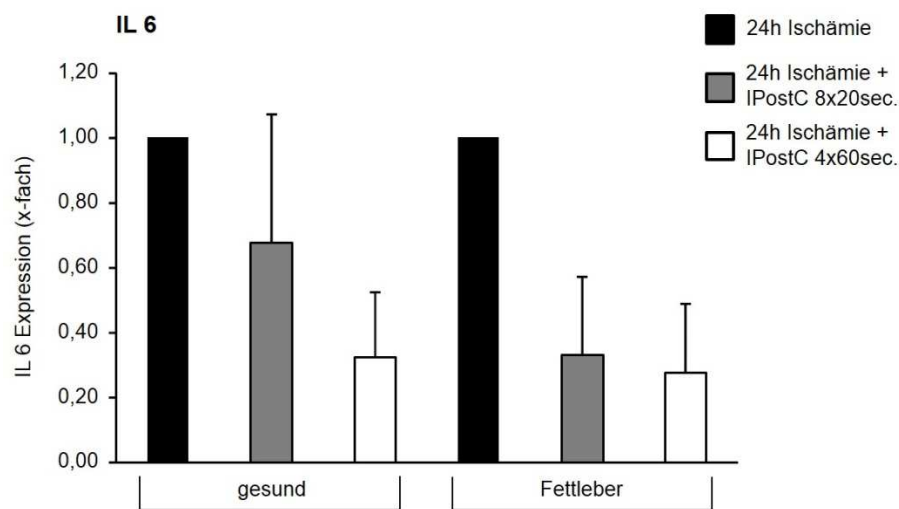
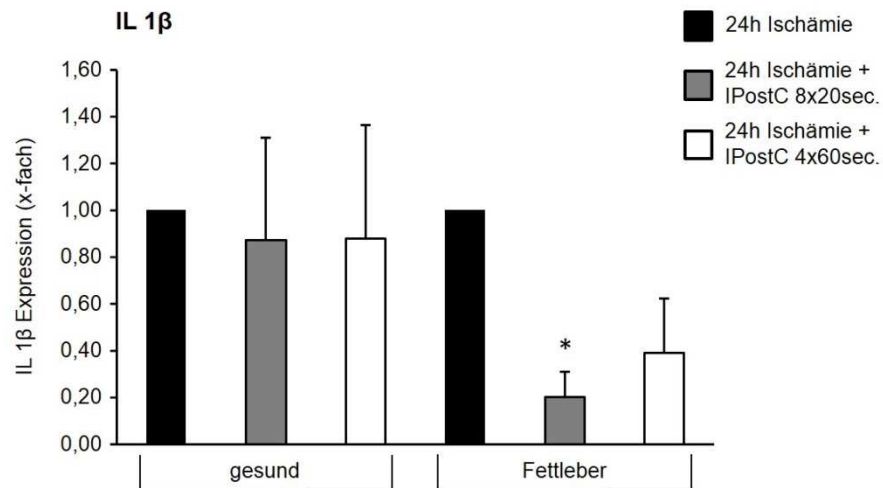
Gensymbol	Offizielle Bezeichnung	Referenzsequenz
<i>Ccl2</i>	<i>Chemokin (C-C Muster) Ligand 2</i>	NM_031530
<i>IL 18</i>	<i>Interleukin 18</i>	NM_019165
<i>IL 1b</i>	<i>Interleukin 1 beta</i>	NM_031512
<i>IL 6</i>	<i>Interleukin 6</i>	NM_012589
<i>TNF</i>	<i>Tumornekrosefaktor</i>	NM_012675
<i>Casp8</i>	<i>Caspase 8</i>	NM_022277
<i>Ripk1</i>	<i>Rezeptor-interagierende Proteinkinase 1</i>	NM_001107350
<i>Ripk3</i>	<i>Rezeptor-interagierende Proteinkinase 3</i>	NM_139342
<i>Actb</i>	<i>Aktin, beta</i>	NM_031144
<i>B2m</i>	<i>Beta-2 Mikroglobulin</i>	NM_012512

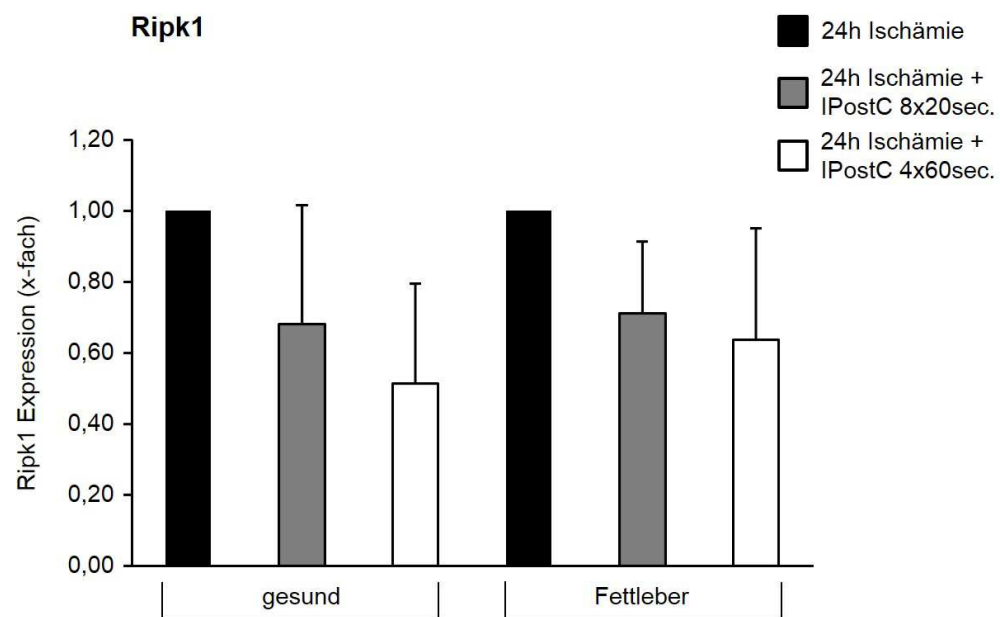
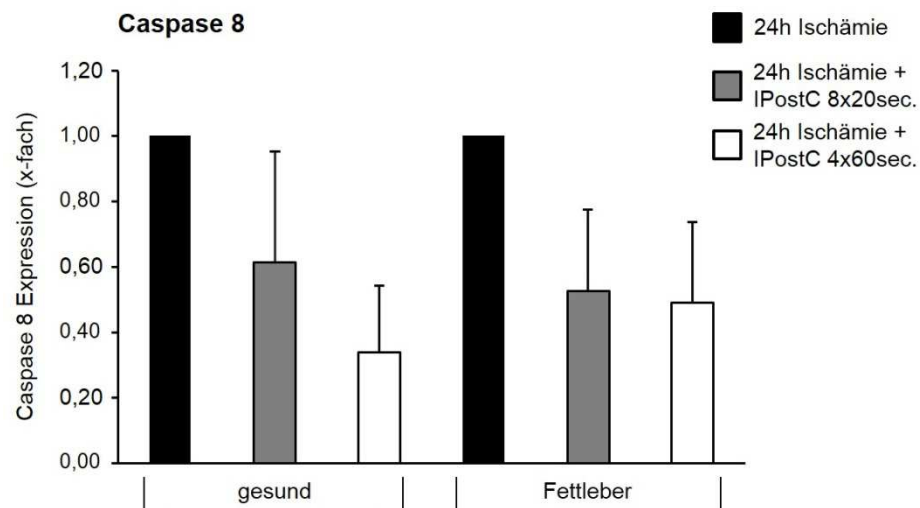
**Tabelle 4.4: Liste der untersuchten Gene nach IPostC**

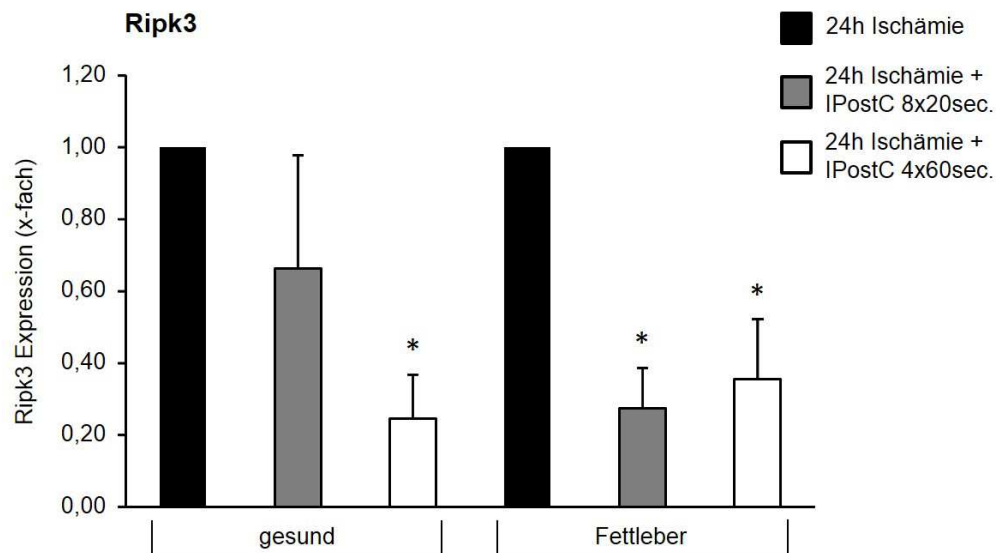
#### 4.5.1 Kalte Ischämie *in situ* ± IPostC

Für die Gene *IL 18* und *Ripk1* (**Bild 4.17**) ergeben sich infolge der IPostC für beide Lebermodelle keine nennenswerten Veränderungen. *IL 6* und *Caspase 8* (**Bild 4.17**) werden in den Interventionsgruppen sowohl in den gesunden Lebern als auch in den Fettlebern zwar sichtbar weniger exprimiert, es ergibt sich jedoch keine statistische Signifikanz. Die Expression der Gene *Ccl2*, *IL 1 $\beta$*  und *TNF* (**Bild 4.17**) ist jeweils in der Fettleber mit der Intervention 8x20sec. signifikant und auch mit 4x60sec. deutlich reduziert, während sich für die gesunde Leber keine Effekte zeigen. *Ripk3* (**Bild 4.17**) wird in der gesunden Leber mit 4x60sec. signifikant herunterreguliert und in der Fettleber sogar mit beiden Interventionsgruppen.







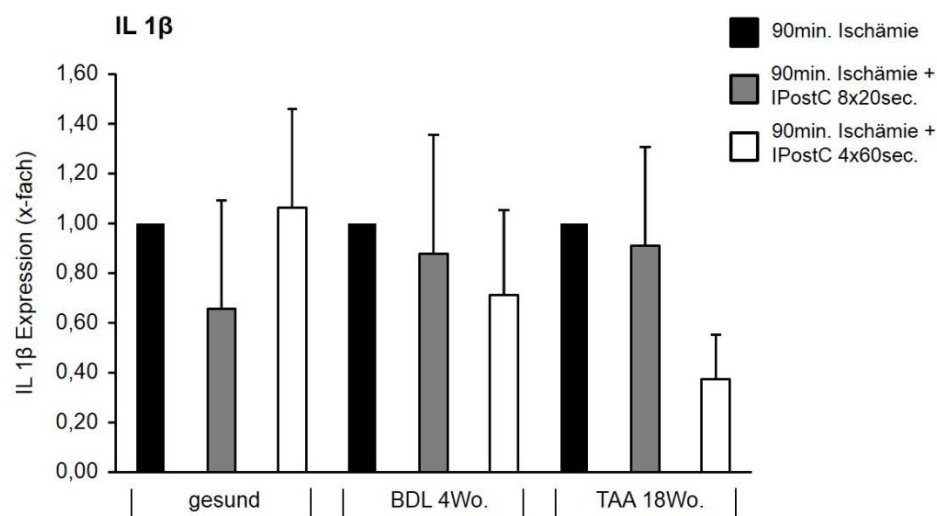
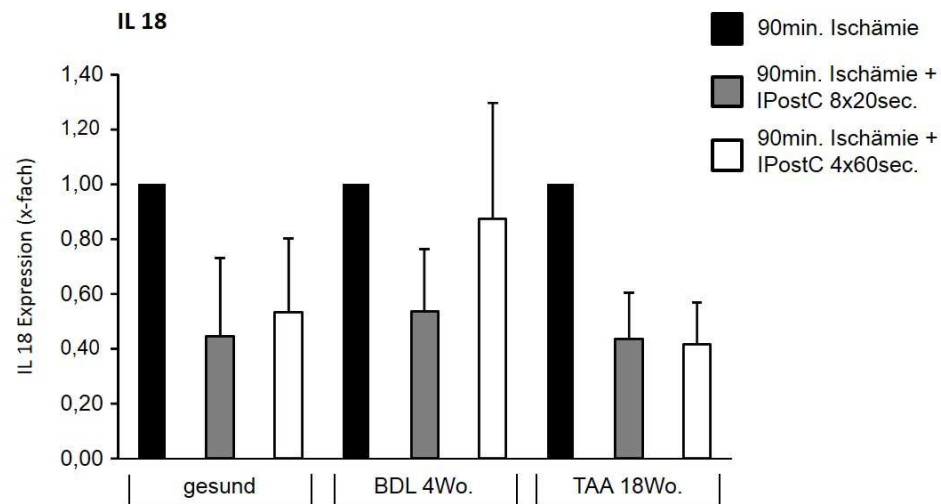
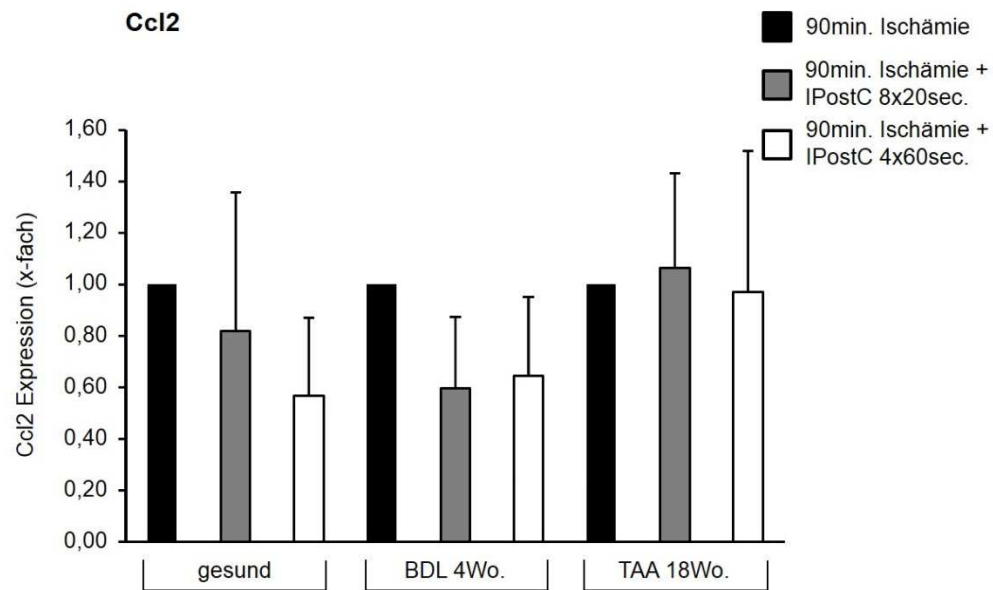


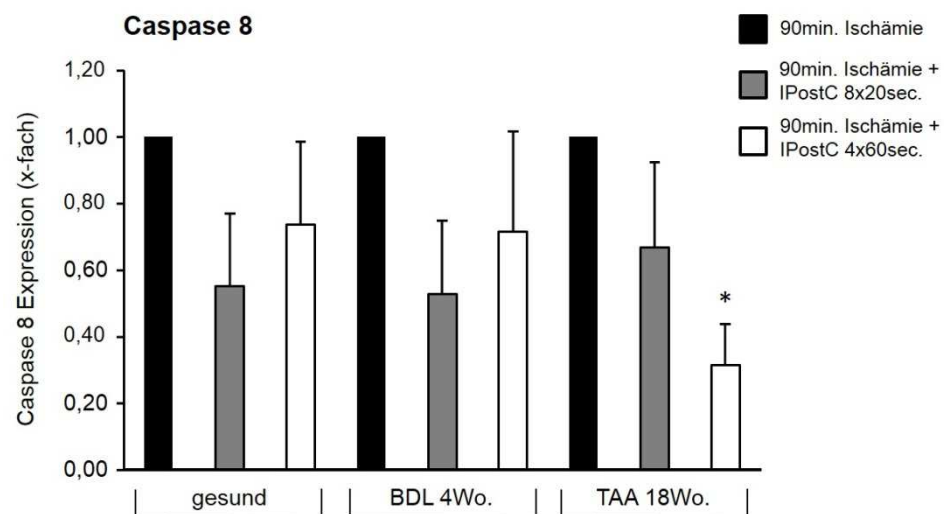
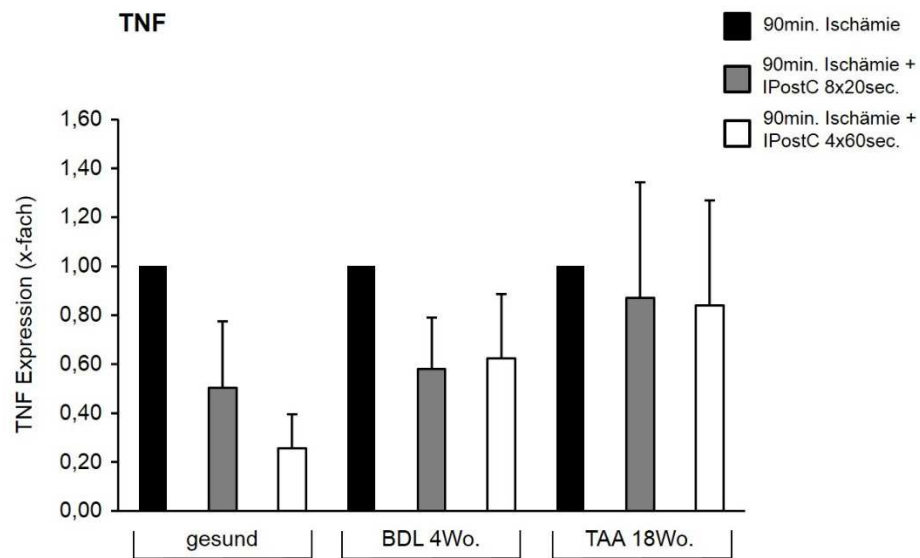
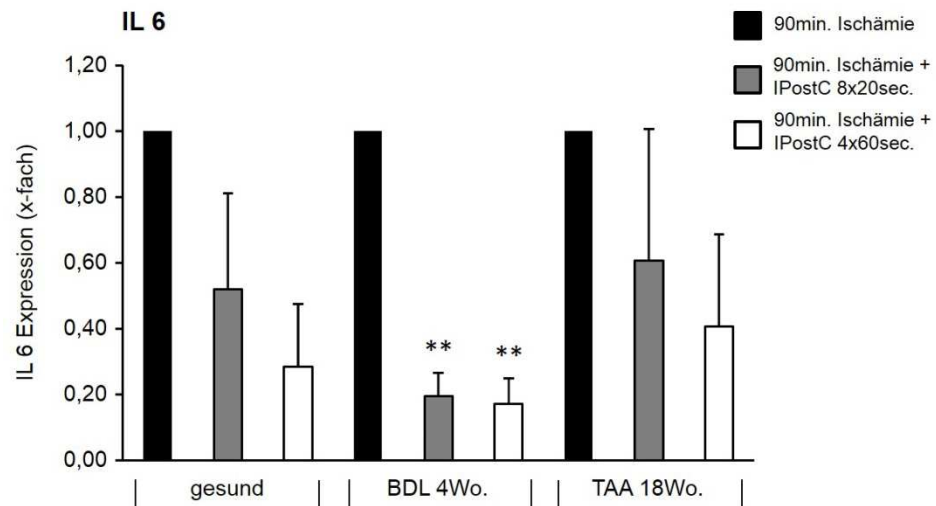
**Bild 4.17: Genexpressionen nach kalter Ischämie *in situ* ± IPostC**

Die Lebern wurden 30min. anperfundiert, anschließend für 24h bei 4°C gelagert, um dann weitere 120min. reperfundiert zu werden. Die Interventionen der IPostC mit 8x20sec. und 4x60sec. erfolgten direkt nach der Ischämie (Kontrolle und Interventionen je n=8). Aus Proben der Lebern wurde Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, die dann in einer RT-qPCR relativ quantifiziert wurde (wie unter 3.8 beschrieben). Die Expressionen sind als x-fache Veränderung zur Kontrollgruppe (als Standard auf 1,0 gesetzt) ± SD dargestellt. \*p<0,05 gibt die Signifikanzen an (Mann-Whitney-U-test).

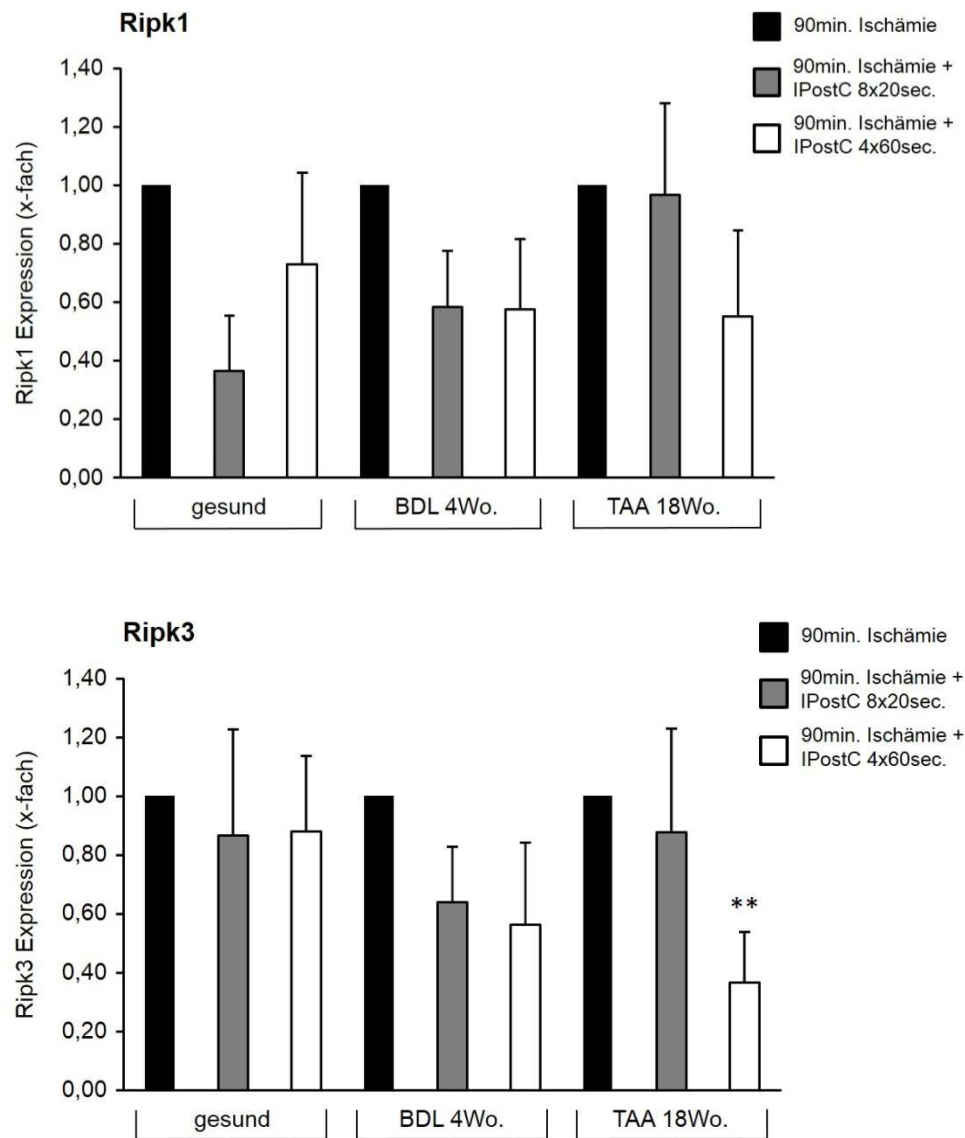
#### 4.5.2 Warme Ischämie *in situ* ± IPostC

*Ccl2*, *IL 1β* und *Ripk1* (**Bild 4.18**) werden in ihrer Expression durch die IPostC in allen drei Lebermodellen nicht wesentlich beeinflusst. *IL 18* wird in den gesunden Lebern und bei TAA 18Wo. infolge IPostC leicht runterreguliert, *TNF* für gesund und BDL 4Wo. (**Bild 4.18**). Die Expression für *IL 6* (**Bild 4.18**) wird in allen Modellen der Leber mit 8x20sec. stärker reduziert als mit 4x60sec. und deutlich signifikant ist diese Reduktion nur für BDL 4Wo. Für *Caspase 8* und *Ripk3* ergibt sich ein ähnliches Ergebnis (**Bild 4.18**). Bei gesunden Lebern und BDL 4Wo. zeigen sich kaum Veränderungen, bei TAA 18Wo. jedoch werden die Gene mit der Intervention 4x60sec. signifikant weniger exprimiert.







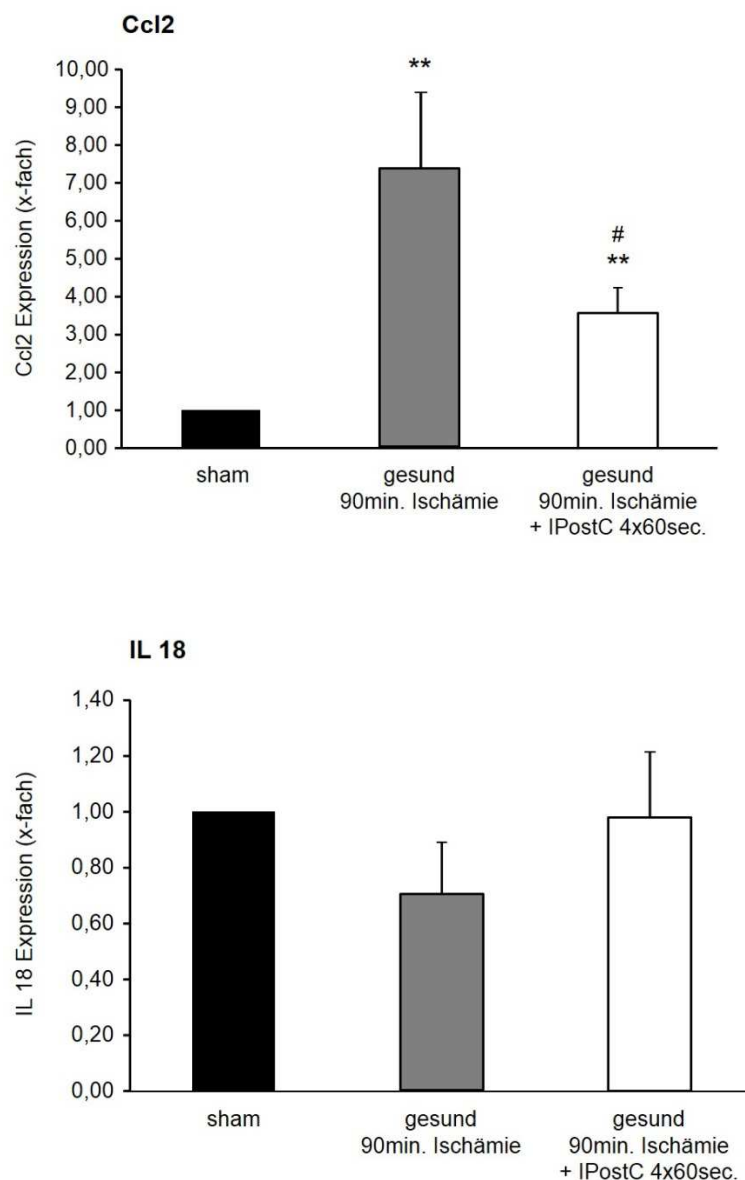


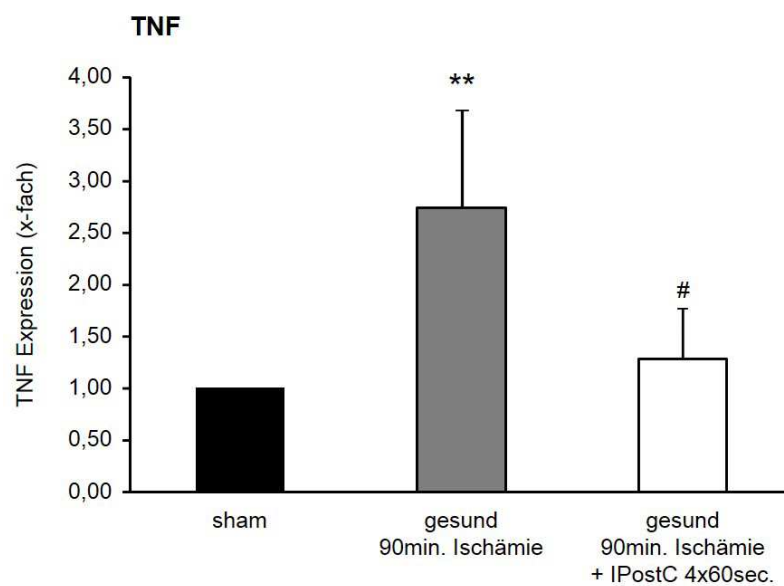
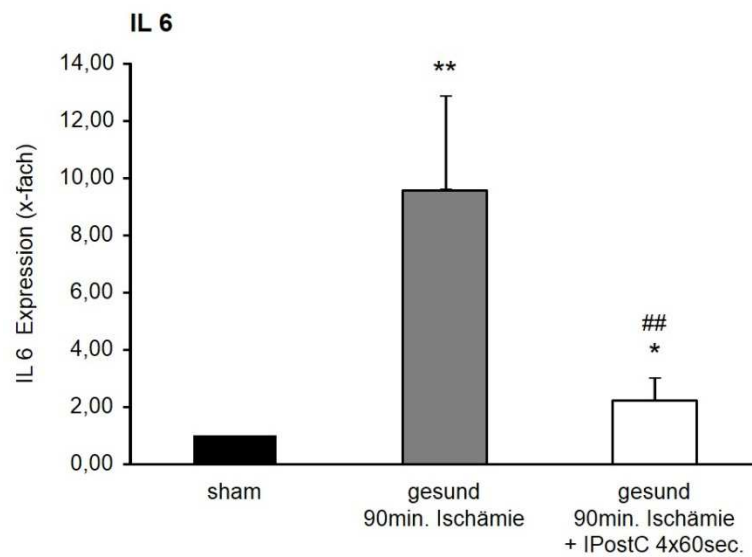
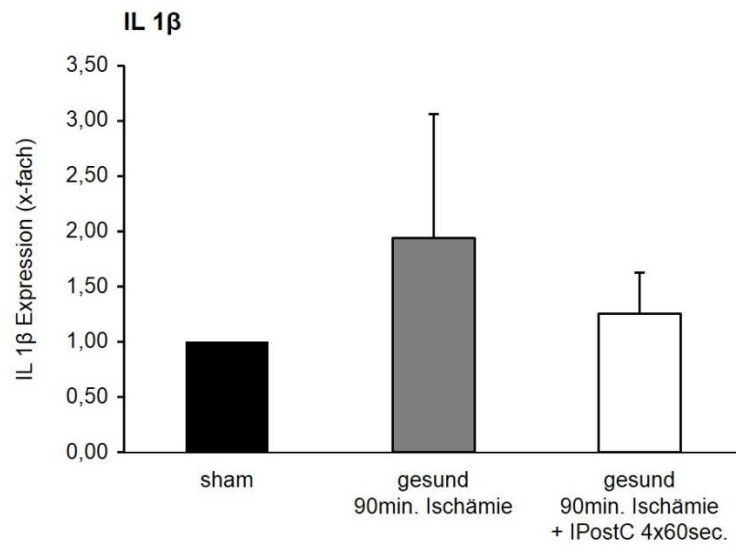
**Bild 4.18: Genexpressionen nach warmer Ischämie *in situ* ± IPostC**

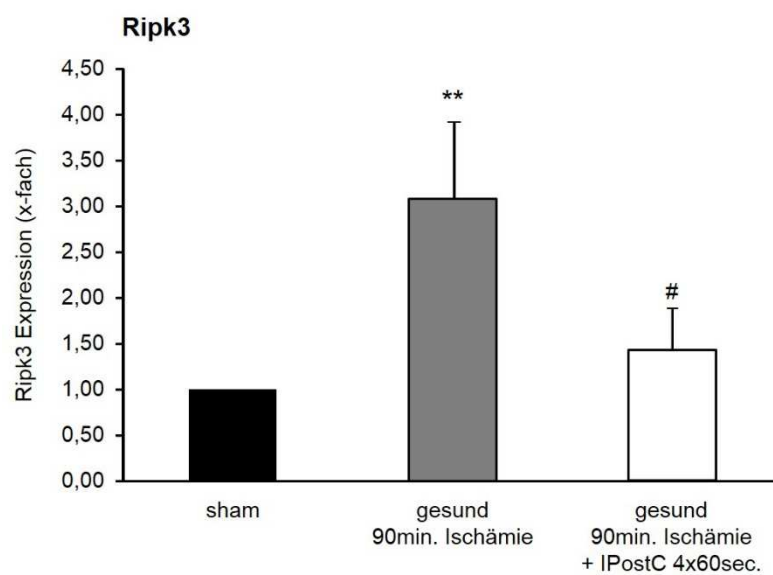
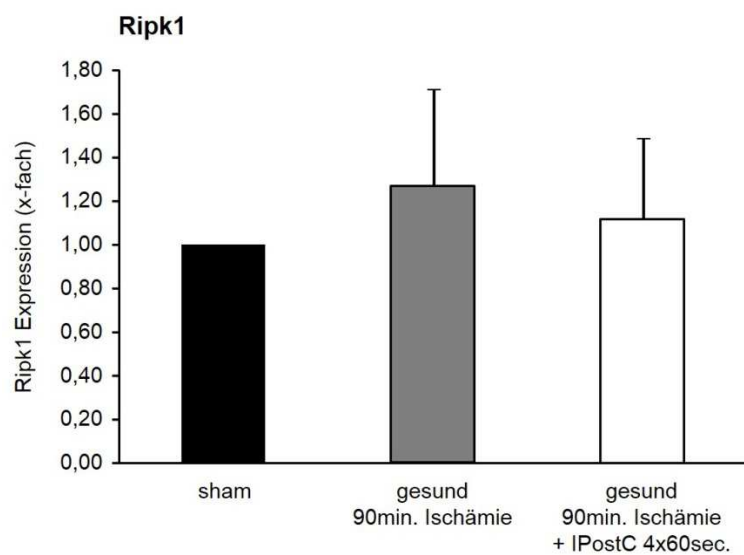
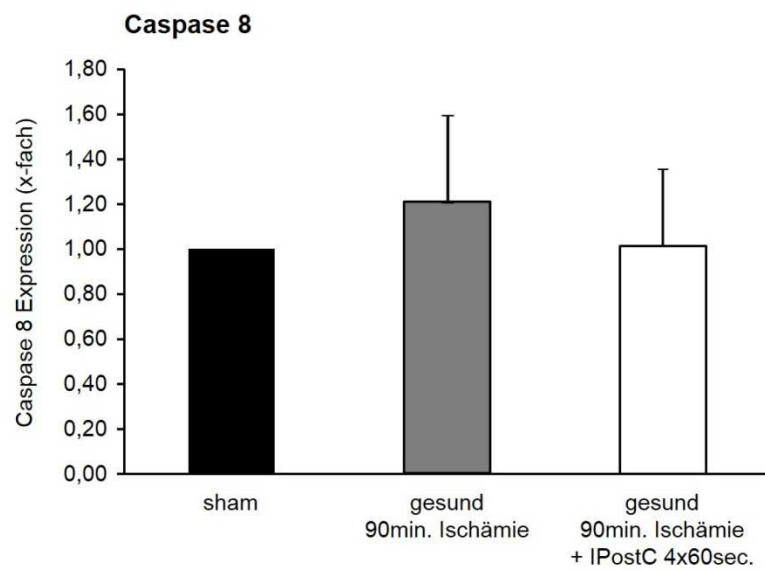
Nach 30min. Anperfusion und einer 90-minütigen Lagerung der Lebern bei 37°C, erfolgte eine Reperfusion über 90min. Direkt im Anschluss an die Ischämie wurden die Interventionen der IPostC mit 8x20sec. und 4x60sec. durchgeführt (Kontrolle und Interventionen je n=8). Es wurde Gesamt-RNA aus den Lebern gewonnen, die nachfolgend zu cDNA synthetisiert und in einer RT-qPCR relativ quantifiziert wurde (wie unter 3.8 beschrieben). Für alle untersuchten Gene sind die Expressionen als x-fache Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (als Standard auf 1,0 gesetzt) ± SD angegeben. \*p<0,05 und \*\*p<0,01 zeigen die Signifikanzen an (Mann-Whitney-U-test).

### 4.5.3 Warme Ischämie *in vivo* ± IPostC

In den *in vivo*-Versuchen wird die Expression der Gene *IL 18*, *Caspase 8* und *Ripk1* (**Bild 4.19**) weder durch 90min. warme Ischämie noch durch Ischämie + IPostC 4x60sec. nennenswert beeinflusst. *IL 1 $\beta$*  (**Bild 4.19**) wird zwar infolge der Ischämie sichtbar hochreguliert und mithilfe der Intervention wieder leicht in der Expression gesenkt, es ergibt sich jedoch keine statistische Signifikanz. Eindeutiger sind die Daten für die Gene *Ccl2*, *IL 6*, *TNF* und *Ripk3* (**Bild 4.19**). Sie werden im Vergleich zur sham-Versuchsgruppe nach 90min. Ischämie deutlich stärker exprimiert und können mithilfe der IPostC wieder signifikant runterreguliert werden.







**Bild 4.19: Genexpressionen nach warmer Ischämie in vivo ± IPostC**

Nach 90min. partieller warmer Ischämie folgten 90min. Reperfusion. Bei sham erfolgten 90+90min. Perfusion. Im Anschluss an die Ischämiephase wurde die Intervention IPostC mit 4x60sec. durchgeführt (sham, Kontrolle und Intervention je n=8). Die Gesamt-RNA wurde aus Proben der Leber isoliert, um anschließend in cDNA umgeschrieben und in einer RT-qPCR relativ quantifiziert zu werden (wie unter 3.8 beschrieben). Für die untersuchten Gene sind die Expressionen als x-fache Veränderung im Vergleich zur sham-Versuchsgruppe (als Standard auf 1,0 gesetzt)  $\pm$  SD angegeben. \* $p < 0,05$  (Kontrolle und Intervention zu sham) und  $^{\#}p < 0,05$  (Intervention zu Kontrolle) sowie \*\* $p < 0,01$  und  $^{\#\#}p < 0,01$  geben die Signifikanzen (Mann-Whitney-U-test) an.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Histologie

Zur Induktion einer Fettleber als marginales Organ für Lebertransplantationen wurde das Modell der HFD verwendet. Neben der milden Steatohepatitis, die die HFD hervorruft, treten eine Vielzahl an metabolischen Risikofaktoren, wie Fettleibigkeit, Glukoseintoleranz und ein Anstieg proinflammatorischer Zytokine im weißen Fettgewebe, bei diesem Fettlebermodell auf [112]. Diese Risikofaktoren spiegeln den westlichen Lebensstandard mit Übergewicht, Diabetes und Bluthochdruck realistisch wieder, aus dem ca. 50% der Spenderorgane für Lebertransplantationen hervorgehen [135]. Daher wurde die HFD als geeignetes Fettlebermodell ausgewählt. Obwohl bei anderen Fütterungsmodellen zur Induktion einer Fettleber, wie der Methionin- und Cholin-defizienten Diät und atherogenen Diäten mit Cholsäure und Cholesterol, im Vergleich zur HFD ein stärkerer Leberschaden mit schwerer Steatohepatitis bis hin zur Bildung von hepatozellulären Karzinomen entsteht, sind metabolische Risikofaktoren, wie sie in der Humanmedizin vorkommen, kaum oder gar nicht vorhanden [112]. Die histologische Auswertung der Fettlebern zeigte im Vergleich zu den gesunden Lebern eine sehr geringe periportale und perizentrale Fibrose und eine starke feintropfige Verfettung (**Bild 4.1**). Die HFD über vier Wochen hat also, wie bereits in der Literatur beschrieben, eine starke Einlagerung von Fett bzw. eine Steatose sowie eine milde Fibrose [76, 112] in der Leber verursacht. Diese Veränderungen machen die Leber, vermutlich aufgrund von zellulären Veränderungen wie einer vermehrten Produktion von ROS und einer eingeschränkten Mikrozirkulation [135], anfälliger gegenüber einem IRI und somit zu einem idealen Modell eines marginalen Organes für die Durchführung einer 24-stündigen kalten Ischämie.

Die Leberfibrose wurde mithilfe einer BDL induziert, welche neben Tetrachlormethan ( $\text{CCl}_4$ ) als etablierte Standardmethode zur Auslösung einer Fibrose gilt und gegenüber  $\text{CCl}_4$  weniger gefährlich für das wissenschaftliche Personal ist und keine Lebertumoren hervorruft [85]. Infolge der BDL wurden im Vergleich zur gesunden Leber eine geringgradige Fibrose und im gesamten Parenchym verteilte starke Gallengangsproliferationen mit fibrotischen Septen sowie eine mäßig starke Entzündung hervorgerufen (**Bild 4.2**). Das sind typische Modifikationen nach einer

BDL und charakteristische Merkmale einer Leberfibrose [85], so dass die BDL 4Wo. Lebern ein geeignetes Fibrosemodell für die warme Ischämie darstellen. Durch die Gabe von TAA über 18Wochen entwickelte sich eine mäßige Fibrose mit Fibroblastenproliferationen und fokal konfluierenden Septen sowie eine mäßige Entzündung und Gallengangsproliferation (**Bild 4.2**). TAA konnte demnach die bereits beschriebenen Modulationen des Lebergewebes hervorrufen [74] und somit ein repräsentatives Zirrhosemodell zur Durchführung einer warmen Ischämie über 90min. schaffen.

Die gesunden Lebern der *in vivo*-Versuche zeigten nach 90min. Ischämie mit und ohne IPostC eine geringgradige Entzündung mit fokalen periportal Granulozyteninfiltraten und einer Abräumreaktion um Einzelzellnekrosen (**Bild 4.3**). Die 90-minütige Ischämie erzeugte so ein anschauliches Modell zur Simulation und Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens.

Sowohl für die Perfusionen als auch für die *in vivo*-Versuche kann anhand der Paraffinschnitte keine Aussage über den möglichen protektiven Effekt der IPostC getroffen werden, da das histologische Bild für alle Versuchsgruppen der Interventionen mit 8x20sec. und 4x60sec. im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe zu inhomogen ist.

Andere experimentelle Studien konnten jedoch bereits in HE-Färbungen einen Effekt durch die IPostC zeigen. Es wurde beobachtet, dass durch IRI entstandene Vakuolisierungen, Fragmentierungen des Zellkerns, Leberzellnekrosen und zelluläre Infiltrationen nach IPostC deutlich vermindert waren [41, 156]. Auch eine Reduktion von Nekrose und Apoptose durch IPostC konnte mithilfe der Stereologie in Paraffinschnitten gezeigt werden [71].

In immunhistologischen Präparaten wurden auch Hinweise auf mögliche Angriffspunkte der IPostC gegeben. Beispielsweise wurden die Expressionen von TNF $\alpha$  und ICAM 1, und damit auch die entzündlichen Prozesse des IRI, im Lebergewebe mit der Intervention IPostC deutlich abgeschwächt [41]. Weitere Studien konnten durch die immunhistochemische Färbung von Bcl-2 ein deutlich stärkeres Vorkommen dieses antiapoptotischen Proteins in der Leber nach IPostC zeigen [127, 128], was auf eine verminderte Apoptose, also einen geringeren Gewebeuntergang, hindeutet.

## 5.2 Einfluss der IPostC auf Laktatdehydrogenase, Gallefluss und portalen Perfusionsdruck

Um erste Hinweise über den Einfluss der IPostC auf den IRI zu erhalten, wurden für die Perfusionen der kalten und warmen Ischämie zunächst die LDH als Parameter für das Ausmaß des Zellschadens, der Gallefluss zur Überprüfung der Organfunktion sowie der portale Perfusionsdruck zur Detektion einer Widerstandserhöhung in den Blutgefäßen erhoben.

Bei den Basalwerten für LDH, Gallefluss und portalen Perfusionsdruck zeigt sich für die Fettleber gegenüber gesunden Lebern eine deutlich erhöhte Absonderung an LDH, dafür aber ein verminderter Gallefluss (**Bild 4.4**). Infolge der HFD und der damit eingehenden Steatose und milden Fibrose [76, 112], wurde ein Zellschaden verursacht, welcher zur Freisetzung der Leberzellen von LDH und einer eingeschränkten Produktion von Galle geführt hat. Die Organfunktion ist somit eingeschränkt. Der portale Perfusionsdruck ist jedoch unverändert (**Bild 4.4**), so dass man davon ausgehen kann, dass keine mikrozirkulatorischen Veränderungen durch die erhöhte Fettzufuhr aufgetreten sind.

Nach 24h Ischämie bei 4°C und 120min. Reperfusion ist die LDH in gesunden Lebern und auch in Fettlebern extrem erhöht (**Bild 4.5**), da durch Mikrozirkulationsstörungen, Zytokine und vor allem oxidativen Stress ein enormer Zelluntergang stattgefunden hat. Mithilfe der IPostC konnte dieser massive Zellschaden insgesamt und in der späten Phase der Reperfusion wiederum signifikant reduziert werden, und zwar in beiden Lebermodellen und sowohl mit 8x20sec. als auch mit 4x60sec. (**Bild 4.5**). Der Gallefluss konnte infolge der IPostC im Gesamtwert signifikant nur für gesund mit 4x60sec., in der späten Phase der Reperfusion in beiden Lebermodellen und jeweils mit beiden Interventionen signifikant gesteigert werden (**Bild 4.6**). Der portale Perfusionsdruck wurde ausschließlich bei den gesunden Lebern mit 4x60sec. am Ende der Perfusion deutlich gesenkt (**Bild 4.7**).

Das bedeutet, dass die IPostC einen protektiven Effekt auf gesunde Lebern und Fettlebern hat, die zuvor einer 24-stündigen kalten Ischämie ausgesetzt wurden, indem der Zellschaden deutlich minimiert wird und zusätzlich die Organfunktion in Bezug auf die Galleproduktion deutlich verbessert wird. Die Tatsache, dass dieser Effekt vor allem in der späten Phase der Reperfusion zu sehen ist, deutet darauf hin,



dass die IPostC eine langfristige Wirkung auf die Leber hat, was natürlich ein zusätzlicher positiver Aspekt ist. Die beiden Interventionen der IPostC wiesen keinen nennenswerten Unterschied in ihrer protektiven Wirkung auf und da wenige lange Zyklen den Gewebestress für die abzuklemmenden Gefäße reduzieren, ist die Intervention mit 4x60sec. vorzuziehen.

An der gesunden Leber wurde der Effekt der IPostC bereits mehrfach beschrieben [70, 127, 145, 152], die Fettleber jedoch wird in der vorliegenden Arbeit erstmalig im Zusammenhang mit IPostC untersucht, so dass gegenwärtig keine Daten zum Vergleich herangezogen werden können. Aber mithilfe der IPC, die im Vergleich zu anderen Möglichkeiten der Prävention der Leber vor IRI der IPostC am nächsten kommt, konnte eine Senkung von ALT, AST und LDH sowie eine Erhöhung von NO und somit eine protektive Wirkung auf die Fettleber nach Ischämie und Reperfusion erzielt werden [57]. Weitere experimentelle Studien zur IPC bei Fettlebern unterschiedlicher Steatosegrade, die vor allem durch genetische Veränderungen induziert wurden, haben Chu et al. [17] in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst. Daraus geht hervor, dass eine steigende grobtropfige Steatose (>30%) mit einem schlechteren Resultat nach IRI für die Leber einhergeht und dass IPC diese >30% steatotischen Lebern vor einem Gewebeschaden schützen kann, die Leberfunktion verbessert (verminderte Serumlevel an Transaminasen) und das Überleben steigert [17]. Eine klinische Studie hat sogar bereits eine reduzierte Abstoßung von Fettlebern im Empfänger mithilfe der IPC gezeigt [26].

Die warme Ischämie *in situ* wurde mit gesunden Lebern, BDL 4Wo.-Lebern und TAA 18Wo.-Lebern durchgeführt. Basal liegt die LDH für BDL 4Wo. infolge eines erhöhten Zellunterganges durch Fibrose und Entzündungsvorgänge deutlich höher als für gesund und TAA 18Wo. (**Bild 4.8**). Der portale Perfusionsdruck ist für BDL 4Wo. und TAA 18Wo., aufgrund der bindegewebigen Umbauvorgänge, basal deutlich gesteigert gegenüber den gesunden Lebern [74, 86] (**Bild 4.8**). Der Gallefluss ist basal für gesund und TAA annähernd gleich (**Bild 4.8**). Die 90-minütige warme Ischämie verursacht in allen drei Lebermodellen eine sehr starke Zellschädigung, was sich durch eine enorme Ausschüttung an LDH (**Bild 4.9**) bemerkbar macht, wobei auffällt, dass die LDH-Werte bei BDL 4Wo. und TAA 18Wo. deutlich geringer ausfallen als bei gesund.

Der Grund dafür könnte sein, dass diese vorgeschädigten Organe aufgrund der Fibrose bzw. Zirrhose bereits weniger intakte Zellen enthalten als gesunde Lebern und zusätzlich wesentlich empfindlicher, also mit einem extrem stärkeren Gewebeschaden, auf die Ischämie reagieren, so dass zur Reperfusion nur noch wenige Zellen übrig sind, die überhaupt noch lysieren und LDH freigegeben können.

Durch die Interventionen der IPostC konnte die LDH im Gesamtwert für gesund, BDL 4Wo. und TAA 18Wo. mit jeweils beiden Interventionen signifikant gesenkt werden, ebenso wie in der späten Phase und für BDL 4Wo. bereits in der frühen Phase der Reperfusion (**Bild 4.9**). Der Gallefluss konnte im Gegenzug für gesund und TAA 18Wo. sowohl im Gesamtwert als auch in der frühen und späten Phase der Reperfusion nach beiden Interventionsgruppen der IPostC signifikant gesteigert werden (**Bild 4.10**). Der portale Perfusionsdruck wurde zum Ende der Reperfusion für alle drei Lebermodelle mit 4x60sec. signifikant gesenkt, der Maximalwert lediglich für BDL 4Wo. und mit 4x60sec. für TAA 18Wo. (**Bild 4.11**).

Die IPostC hat also auch nach 90min. warmer Ischämie aufgrund eines verminderten Zellunterganges und einer verbesserten Organfunktion eine protektive Wirkung auf die Leber, und zwar nicht nur auf die gesunde Leber, sondern auch auf fibrotische bzw. zirrhotische Organe. Zusätzlich wird für BDL 4Wo. der portale Perfusionsdruck durch eine Senkung positiv beeinflusst. In Bezug auf die LDH ist auch für die warme Ischämie der Effekt der IPostC erst in der späten Phase der Reperfusion erkennbar und übt demnach vermutlich über das untersuchte Zeitfenster der Reperfusion hinaus einen protektiven Einfluss auf die Leber aus. Ähnlich wie nach der kalten Ischämie, haben die beiden Interventionsgruppen der IPostC einen annähernd gleichen positiven Einfluss auf die Lebern, so dass auch hier aufgrund der Gewebeschonung der Gefäße die Intervention mit 4x60sec. zu bevorzugen ist. Außerdem spricht die signifikante Reduktion des portalen Perfusionsdruckes in allen drei Lebermodellen am Ende der Reperfusion ebenfalls für die IPostC mit 4x60sec.

Wie bei der Fettleber, gibt es auch für die fibrotische bzw. zirrhotische Leber bisher keine Erkenntnisse zur IPostC nach Ischämie und Reperfusion. Lediglich zwei experimentelle Studien zur IPC beschreiben einen protektiven Effekt auf zirrhotische Maus- und Rattenlebern, indem Nekrose und Apoptose deutlich reduziert wurden bzw. ALT und AST gesenkt und NO und SOD in Serum und Gewebe gesteigert werden konnten [56, 151].

### 5.3 Einfluss der IPostC auf „Folgeperfusionen“

Da der protektive Effekt der IPostC nach kalter und warmer Ischämie in den Perfusionen einem Mechanismus bzw. einer Reihe von Reaktionen in der Leber unterliegen muss, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt: Eine gesunde Leber wurde einer 90-minütigen warmen Ischämie ausgesetzt und anschließend mit und ohne IPostC mit 4x60sec. reperfundiert. Das Perfusat der gesamten Reperfusion wurde gesammelt, um damit eine zweite gesunde Leber zu perfundieren (wie unter 3.1.6 beschrieben). Aus logistischen Gründen haben wir uns dabei für die Ischämie-Versuche auf die warme Ischämie und gesunde Lebern beschränkt. Die beiden Interventionen der IPostC haben in den Perfusionen einen ähnlichen protektiven Effekt nach kalter und warmer Ischämie gezeigt und da wenige lange Zyklen vermutlich schonender für die Gefäße sind, haben wir bei den „Folgeperfusionen“ lediglich die Interventionsgruppe mit 4x60sec. durchgeführt.

Die Lebern, die zur Perfusion ein postkonditioniertes Perfusat erhielten, zeigten eine deutlich geringere Ausschüttung an LDH sowie eine erhöhte Galleproduktion gegenüber den Lebern, die mit nicht-postkonditioniertem Perfusat behandelt wurden (**Bild 4.12**). Der portale Perfusionsdruck wurde dabei nicht signifikant beeinflusst (**Bild 4.12**).

Daraus ist zu schließen, dass aufgrund der IPostC vermutlich weniger zellschädigende Metaboliten von der Leber in das Perfusat abgegeben werden, so dass dieses ein geringeres Schädigungspotenzial für die „Folgeperfusion“ besitzt.

Diese Reduktion der zellschädigenden Metaboliten könnte durch die zuvor beschriebenen Trigger, die infolge der IPostC angehäuft werden, sowie darauf folgende Metaboliten und Endeffektoren vermittelt werden [96].

Ein weiterer Effekt der IPostC könnte eine dosierte Zufuhr von Sauerstoff sein. So können die pH-abhängigen Enzyme nur in Etappen aktiviert und die oxidativen Prozesse gedämpft oder unvollständig in Gang gebracht werden.

Da dieser Versuchsaufbau der „Folgeperfusionen“ bisher nicht durchgeführt wurde, gibt es auch keine vergleichbaren Daten, die hier herangezogen werden könnten.

## 5.4 Einfluss der IPostC auf Thromboxan B<sub>2</sub>

Da TXA<sub>2</sub> im Zusammenspiel mit NO und Endothelin eine zentrale Rolle bei der gestörten Mikrozirkulation während einer Ischämie spielt [102, 105] und die IPostC in den Perfusionen sowohl nach kalter als auch nach warmer Ischämie nicht nur einen Effekt auf die LDH und den Gallefluss, sondern geringfügig auch auf den portalen Perfusionsdruck gezeigt hat, wurde zusätzlich TXB<sub>2</sub> im Perfusat (wie unter 3.6.1 beschrieben) gemessen. TXB<sub>2</sub> ist der inaktive Metabolit des TXA<sub>2</sub>. TXA<sub>2</sub> wiederum ist ein Arachidonsäurederivat und übt G-Protein-vermittelt verschiedene Funktionen in diversen Organen und Zellen, wie z.B. KCs und Endothelzellen, aus [94]. Neben der Aktivierung der Blutplättchen und der Vasokonstriktion, die für die Verengung der Lebersinusoiden und damit für die verminderte Mikrozirkulation im Verlauf eines IRI verantwortlich ist, trägt TXA<sub>2</sub> auch zu entzündlichen Prozessen bei, indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen erhöht [94]. Bei Lebererkrankungen wie Fibrose und Zirrhose hat TXA<sub>2</sub> eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung der portalen Hypertension als schwerwiegende Komplikation [125].

Die Freisetzung des TXB<sub>2</sub> von gesunden Lebern und Fettlebern ist basal annähernd gleich, wird jedoch infolge einer 24-stündigen Ischämie deutlich erhöht (**Bild 4.13**). Die Reduzierung des TXB<sub>2</sub> infolge der IPostC erfolgt vor allem in der späten Phase der Reperfusion, für gesund mit beiden Interventionsgruppen, für die Fettleber signifikant nur mit 4x60sec. (**Bild 4.13**). Die Ausschüttung des Vasokonstriktors TXA<sub>2</sub> kann also mithilfe der IPostC vermindert werden, wodurch die Mikrozirkulation in den Lebersinusoiden vermutlich verbessert wird, so dass die Leberzellen eine optimale Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zur Aufrechterhaltung ihrer Funktionen erhalten. Dieser Aspekt ist vor allem für die Fettleber sehr bedeutend, denn es ist bereits bekannt, dass die Fetteinlagerungen im Zytoplasma der Hepatozyten mit einem vergrößerten Zellvolumen verbunden ist, was den Sinusoidalraum schon im Vorfeld der Ischämie und Reperfusion einengt und die Mikrozirkulation verschlechtert [135]. Zusätzlich wurde festgestellt, dass der hohe Anteil an Omega-6:Omega-3 vielfach ungesättigten Fettsäuren in steatotischen Lebern zu einer verstärkten Aktivierung von KCs führt, wohingegen eine Diät mit Omega-3 vielfach ungesättigten Fettsäuren diese Aktivierung und die Produktion von TXA<sub>2</sub> verminderte, so dass die Durchblutung der Sinusoiden verbessert und der IRI abgeschwächt wurde [30, 31].

Die Basalwerte an  $\text{TXB}_2$  sind für BDL 4Wo. und TAA 18Wo. sehr viel höher als für gesunde Lebern (**Bild 4.14**). Verantwortlich dafür sind höchstwahrscheinlich KCs, die aufgrund der mit Fibrose und Zirrhose verbundenen Entzündungs- und Umbauvorgänge in der Leber aktiviert werden,  $\text{TXA}_2$  freisetzen und so den Druck im Organ wie auch in der Pfortader erhöhen [125]. Nach 90min. Ischämie und 90min. Reperfusion steigt die Freisetzung an  $\text{TXB}_2$  für alle drei Lebermodelle an und kann dann infolge der IPostC im Gesamtwert für gesund mit beiden Interventionen und für BDL 4Wo. und TAA 18Wo. mit 4x60sec. deutlich reduziert werden (**Bild 4.14**). Auch die späte Phase der Reperfusion zeigt eine starke Reduzierung des  $\text{TXB}_2$ , lediglich die Intervention mit 8x20sec. für BDL 4Wo. ist nicht signifikant (**Bild 4.14**). Demnach wirkt sich die IPostC auch nach der warmen Ischämie in gesunden, fibrotischen und zirrhotischen Lebern protektiv in Bezug auf die Mikrozirkulation in der Leber aus, indem möglicherweise die Ausschüttung des Vasokonstriktors  $\text{TXA}_2$  vermindert wird und die Lebersinusoide ausreichend durchblutet werden.

Dies sind die ersten Daten zur IPostC bei fibrotischen und zirrhotischen Lebern, so dass ein Vergleich mit bereits existierenden Erkenntnissen an dieser Stelle nicht möglich ist. Eine experimentelle Studie zur IPC bei der Leberzirrhose trifft zwar keine Aussage zu  $\text{TXB}_2$ , aber es wurde ein signifikant erhöhtes Level an NO im Serum der Versuchsgruppen der IPC festgestellt [151], welches als Vasodilatator für einen guten Blutfluss in den Sinusoiden sorgt und so auf einen Einfluss der IPC auf die Mikrozirkulation hindeutet.

## 5.5 Einfluss der IPostC auf Parameter im Serum

Nachdem die IPostC in den Perfusionen *in situ* einen protektiven Effekt gezeigt hat, galt es nun den Einfluss dieser Intervention am lebenden (*in vivo*) Organismus zu untersuchen und die zuvor beobachtete Wirkung zu bestätigen. Da die beiden Interventionen der IPostC einen ähnlich protektiven Effekt zeigten und wenige lange Zyklen vermutlich schonender für die Gefäße sind, haben wir uns bei der Durchführung der *in vivo*-Versuche auf die Interventionsgruppe mit 4x60sec. beschränkt.

Zuerst wurden die wichtigsten Transaminasen der Leber (AST und ALT) und erneut die LDH bewertet. Die Transaminasen spielen eine wichtige Rolle für den Zellstoffwechsel, genauer gesagt beim Ab- und Umbau von Aminosäuren und sind in den Mitochondrien und im Zytoplasma lokalisiert. Diese Enzyme steigen im Blut vor allem bei akuten schweren Leberschädigungen an, zu denen auch der IRI gehört, während sie bei chronischen Erkrankungen wesentlich niedriger liegen. Somit sind sie, ähnlich wie die LDH, ein wichtiger Indikator für das Ausmaß des Zellschadens in der Leber.

Die Werte im Serum für AST, ALT und LDH stiegen infolge der warmen Ischämie gegenüber der Versuchsgruppe sham 90min. sehr stark und bestätigten so die akute starke Zellschädigung infolge des IRI (**Bild 4.15**). Durch die IPostC mit 4x60sec. konnte dieser Anstieg der Leberenzyme und damit der Zellschaden wieder deutlich reduziert werden (**Bild 4.15**).

Aufgrund der enormen Relevanz der hepatischen Transaminasen im klinischen Alltag, gibt es bereits einige experimentelle Studien, die ebenfalls eine Senkung von AST und ALT und somit einen protektiven Effekt durch IPostC auf die Leber beschrieben haben [77, 152, 155, 156, 163].

Zusätzlich zu den Enzymen wurden zwei für die Entstehung des IRI sehr bedeutende inflammatorische Zytokine im Serum der unbehandelten und behandelten Tiere gemessen. Das TNF $\alpha$  ist proinflammatorisch und wird im Verlauf der Ischämie vor allem von KCs gebildet und trägt zur Akkumulation von Neutrophilen und CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten bei [2, 62]. Das lösliche IL 6 wird ebenfalls von aktivierten KCs gebildet und steigt demnach infolge entzündlicher Prozesse stark im Blut an [62].

Als antiinflammatorisches Zytokin begrenzt IL 6 die Akkumulation von Neutrophilen in entzündetem Gewebe und ist sowohl mit proapoptotischen als auch antiapoptotischen Komponenten an der Regulation des Zelltodes von Leukozyten beteiligt [60].

Beide Zytokine stiegen nach 90min. warmer Ischämie gegenüber sham 90min. deutlich im Serum an und konnten mithilfe der IPostC mit 4x60sec. wieder signifikant reduziert werden (**Bild 4.16**).

Die Senkung von TNF $\alpha$  im Serum infolge der IPostC wurde bereits an einem Mauslebermodell beobachtet [122]. Aber auch die reduzierte Expression von TNF $\alpha$  im Lebergewebe nach IPostC wurde immunhistochemisch [41] sowie mittels Isolierung von Gesamt-RNA und anschließender RT-PCR beschrieben [145]. Zum IL 6 kann an dieser Stelle lediglich eine experimentelle Studie zum Einfluss der RPostC auf ein Lipopolysaccharid-induziertes systemisches Entzündungsmodell der Maus herangezogen werden. In dieser Arbeit konnte durch RPostC eine Senkung von IL 6 und auch TNF $\alpha$  im Serum erzielt werden [67], was vermuten lässt, dass IPostC, ob direkt oder indirekt ausgeführt, Einfluss auf inflammatorische Zytokine nehmen kann, indem sie diese senkt und so entzündliche Vorgänge abschwächt. Dabei könnten die Zytokine als Trigger zum Einsatz kommen (wie unter 1.3.3.2 beschrieben) und über JAK und STAT die Transkription spezifischer Zielgene initiieren, welche wiederum den programmierten Zelltod beeinflussen [50, 97]. Andererseits wäre es möglich, dass aufgrund der dosierten Zufuhr von Sauerstoff zu Beginn der Reperfusion die Entzündungsprozesse abgeschwächt werden und, wie schon bei den „Folgeperfusionen beobachtet“, weniger zellschädigende Metaboliten inklusive inflammatorischer Zytokine von der Leber abgegeben werden.

Das schnelle und einfache Verfahren der IPostC zeigt also auch *in vivo* eine schützende Wirkung nach Ischämie und Reperfusion für die Leber, indem die Zellschädigung stark vermindert wird und Zytokine, die einen entscheidenden Beitrag zur Ausprägung des IRI leisten, deutlich gesenkt werden. Das bestätigt die Ergebnisse von LDH und Gallefluss nach den Perfusionen und den protektiven Effekt der IPostC nach kalter und warmer Ischämie.

## 5.6 Einfluss der IPostC auf Genexpressionen

Die Folgeperfusionen, die Messung des  $\text{TXB}_2$  im Perfusat sowie die Bestimmung von Enzymen und Zytokinen im Serum haben bereits erste Hinweise auf mögliche Angriffspunkte der IPostC im Kampf gegen den IRI gegeben. Um diese Ansätze weiter zu verfolgen, wurde die Expression von acht verschiedenen Genen nach kalter und warmer Ischämie *in situ* und warmer Ischämie *in vivo* mit und ohne IPostC untersucht.

Das Chemokin *Ccl2*, welches vor allem von KCs, geschädigten Hepatozyten und aktivierten hepatischen Sternzellen (HSCs) freigesetzt wird, wurde dabei als Indikator für die Akkumulation und Aktivierung von immunologisch aktiven Zellen, wie Makrophagen und dendritische Zellen, bestimmt [86]. Es wurde außerdem beschrieben, dass *Ccl2* in Fettlebern hochreguliert bzw. die Expression von *Ccl2* auf Hepatozyten aktiviert wird. Zur hepatischen Fibrogenese trägt *Ccl2* ebenfalls bei, indem es proinflammatorisch, proangiogenetisch und profibrotisch wirkt und einer möglichen Fibroserückbildung entgegenwirkt [86]. Somit ist dieses Chemokin in den verschiedenen Modellen zu Fettleber, Fibrose und Zirrhose repräsentativ vertreten und gut zu vergleichen.

In den *in vivo*-Versuchen wurde *Ccl2* im Vergleich zur Versuchsgruppe sham 90min. hochreguliert (**Bild 4.19**) und in der Interventionsgruppe mit IPostC 4x60sec. wieder signifikant runterreguliert (**Bild 4.19**). Bei den Perfusionen zur kalten Ischämie konnte die Expression von *Ccl2* in der Fettleber mit IPostC 8x20sec. signifikant gesenkt werden (**Bild 4.17**). Diese Ergebnisse geben den Hinweis auf eine reduzierte Chemokinexpression infolge der IPostC, wodurch vermutlich die Akkumulation und Aktivierung von Immunzellen reduziert wird, so dass diese keinen weiteren Zellschaden induzieren können. Das *Ccl2* wurde zwar bisher nicht im Zusammenhang mit IPostC zum Schutz der Leber vor IRI analysiert, aber es wurde immunhistochemisch gezeigt, dass die Expression von ICAM 1, was ähnlich wie *Ccl2* zur Rekrutierung von Neutrophilen beiträgt, im Lebergewebe durch IPostC deutlich vermindert werden konnte [41].

Als wesentliche Bestandteile des NLRP3 Inflammasoms wurden IL 1 $\beta$  und IL 18 untersucht. Bei diesem Inflammasom handelt es sich um einen Proteinkomplex des unspezifischen Immunsystems in KCs und Neutrophilen. Nach Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms durch PAMPs, einen erhöhten intrazellulären Kaliumspiegel



oder ROS, setzt Caspase 1 die Zytokin-Vorstufen pro-IL 1 $\beta$  und pro-IL 18 zu IL 1 $\beta$  und IL 18 um [129]. Die beiden proinflammatorischen Zytokine tragen durch Rekrutierung von Immunzellen und Auslösung des programmierten Zelltodes erheblich zum IRI bei [129].

Lediglich für die Fettlebern nach kalter Ischämie *in situ* konnte die Expression von IL 1 $\beta$  mit der Intervention der IPostC mit 8x20sec. signifikant herunterreguliert werden (**Bild 4.17**). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse bewertet, scheint das NLRP3 Inflammasom mit den Komponenten IL 1 $\beta$  und IL 18 nicht wesentlich durch die IPostC beeinflusst zu werden. Die bisher durchgeführten experimentellen Studien zur IPostC an der Leber liefern keine Daten und somit ebenfalls keinen Hinweis auf eine Rolle des Inflammasoms im Mechanismus der IPostC.

Erneut wurden die Zytokine IL 6 und TNF bzw. deren Genexpressionen betrachtet, um ihre Rolle beim Mechanismus der IPostC, die sich aufgrund der zuvor erhobenen Werte im Serum andeutet, zu bestätigen. Das antiinflammatorische IL 6 wird während entzündlichen Prozessen wie dem IRI verstärkt von KCs freigesetzt [62], hemmt in dem betroffenen Gewebe die Akkumulation von Neutrophilen und reguliert den programmierten Zelltod der Leukozyten [60]. Auch das proinflammatorische Zytokin TNF wird von KCs gebildet und trägt zur Akkumulation von Neutrophilen und CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten bei [2, 62].

Nach warmer Ischämie *in vivo* wurden die Gene für IL 6 und TNF gegenüber der Versuchsgruppe sham 90min. verstärkt exprimiert und mithilfe der Intervention IPostC mit 4x60sec. wieder runterreguliert (**Bild 4.19**). In den Perfusionen zur warmen Ischämie wurde die Expression für IL 6 bei BDL 4Wo. mit beiden Interventionen der IPostC signifikant verringert (**Bild 4.18**). TNF konnte in Fettlebern nach kalter Ischämie *in situ* mithilfe der Intervention 8x20sec. signifikant herunterreguliert werden (**Bild 4.17**). Diese Daten bestätigen die Beteiligung der inflammatorischen Zytokine IL 6 und TNF am protektiven Effekt der IPostC auf die Leber.

Eine reduzierte Expression von TNF $\alpha$  im Lebergewebe nach IPostC konnte auch immunhistochemisch nachgewiesen werden [41]. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus der Leber und anschließender RT-PCR zeigte ebenfalls eine Herunterregulierung von TNF $\alpha$  nach IPostC [145]. IL 6 wurde bisher lediglich in einer experimentellen Studie zum Einfluss der RPostC auf ein Lipopolysaccharid-induziertes systemisches Entzündungsmodell der Maus beschrieben. RPostC

konnte in diesem Modell IL 6 und auch TNF $\alpha$  im Serum senken [67]. Man kann demnach davon ausgehen, dass direkte und indirekte IPostC inflammatorische Zytokine vermindern und die entzündlichen Prozesse des IRI abmildern kann. Wie zuvor unter 5.5 beschrieben, könnte dieser Effekt auf unterschiedliche Weise zustande kommen. Einerseits wäre es möglich, dass die Zytokine als Trigger fungieren (wie unter 1.3.3.2 beschrieben), indem sie über JAK und STAT die Transkription spezifischer Zielgene einleiten und so den programmierten Zelltod regulieren [50, 97]. Andererseits ist es denkbar, dass die portionierte Zufuhr von Sauerstoff am Anfang der Reperfusion einen dämpfenden Effekt auf die Entzündungsreaktionen des IRI hat, so dass weniger zellschädigende Metaboliten, zu denen auch inflammatorische Zytokine gehören, von der Leber abgegeben werden.

Auch die Gene für *Caspase 8*, *Ripk1* und *Ripk3* wurden ermittelt. *Ripk1* und *Ripk3* regulieren durch die Bildung eines Nekrosoms die Nekroptose (eine kontrollierte Nekrose) [36], die vermutlich neben Apoptose und Nekrose für den Zelluntergang nach Ischämie und Reperfusion verantwortlich ist. *Caspase 8* kommt dabei als Regulator zum Einsatz, denn die Aktivierung von *Caspase 8* spaltet *Ripk1* und *Ripk3*, so dass die Apoptose eintritt [84]. Die Hemmung von *Caspase 8* führt jedoch durch die Verbindung von *Ripk1* und *Ripk3* zum Nekrosom und löst so die Nekroptose aus [84]. Außerdem wird die Nekroptose durch die Freisetzung von CDAMPs infolge des Zelltodes durch Nekrose initiiert [78]. So erlauben die Expressionen von *Caspase 8*, *Ripk1* und *Ripk3* eine Einschätzung über den Anteil an Nekrose, Apoptose und Nekroptose am Zelluntergang erlauben und geben eventuell einen Hinweis, auf welche dieser Varianten von Zelltod die IPostC den größten Einfluss ausübt.

Die Expression von *Ripk3* konnte *in vivo* nach einer Hochregulierung im Vergleich zur Versuchsgruppe sham 90min. mithilfe der IPostC mit 4x60sec. reduziert werden (**Bild 4.19**). Bei den Perfusionen zur warmen Ischämie wurde *Ripk3* für TAA 18Wo. nach IPostC 4x60sec. signifikant geringer exprimiert (**Bild 4.18**) und auch nach kalter Ischämie konnte *Ripk3* in gesunden Lebern und Fettlebern mit IPostC signifikant herunterreguliert werden (**Bild 4.17**). Ausgehend von diesen Ergebnissen kommt *Ripk3* wahrscheinlich eine wichtige Bedeutung zu, da es infolge der IPostC in der Expression gesenkt wird und so weniger Nekroptose auslösen kann, was die Zellschädigung im Verlauf der Reperfusion möglicherweise deutlich einschränkt.

Die Nekroptose mit ihren drei Komponenten Caspase 8, Ripk1 und Ripk3 wurde bisher nicht in Bezug auf die IPostC an der Leber untersucht. Aber Indikatoren für Apoptose und Nekrose, wie z.B. Cytochrom c, Bcl-2 oder die Histopathologie, wurden bestimmt und zeigten eine deutliche Minderung des Zelltodes in der Leber infolge einer IPostC nach kalter und warmer Ischämie **[71, 77, 128, 144]**. Auch STAT-Proteinen, die als Transkriptionsfaktoren verschiedener Zielgene den programmierten Zelltod beeinflussen **[50, 97]**, scheinen im Zusammenspiel mit TNF $\alpha$  und IL 6 im Mechanismus der IPostC mitzuwirken **[149]**.

Für Fettlebern und zirrhotische Lebern existieren wiederum nur Daten zur Prävention des IRI durch IPC, welche ebenfalls eine Reduktion von Apoptose und Nekrose infolge der Intervention zeigen **[17, 26, 56]**.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand dieser Arbeit war die ischämische Postkonditionierung (IPostC) als einfache und praktisch gut umsetzbare Methode zur Reduzierung des Ischämie-Reperfusionsschadens (IRI) in Lebern nach kalter (Modell für Transplantation) und warmer (Modell für Teilresektion) Ischämie. Das Prinzip der IPostC besteht in kurzen Perioden von Ischämie und Reperfusion im Wechsel nach der Ischämiephase (bei Transplantationen im Organempfänger) und direkt vor der kontinuierlichen Reperfusion.

Der Fokus der vorliegenden Dissertation lag auf Fettlebern, die als marginale Organe aufgrund des Organmangels häufig für Lebertransplantationen verwendet werden müssen, sowie fibrotischen und zirrhotischen Lebern, welche infolge eines hepatozellulären Karzinoms Teilresektionen unterzogen werden müssen. Weder für Fettlebern noch für fibrotische und zirrhotische Lebern existieren bisher Daten zur IPostC.

Die IPostC zeigte nach kalter und warmer Ischämie in isolierten Rattenleberperfusionsen sowohl in gesunden Lebern als auch in vorgeschädigten Lebern einen protektiven Effekt. Die Freisetzung der Laktatdehydrogenase reduziert und der Gallefluss gesteigert wurde, was für einen verminderten Zellschaden und eine verbesserte Organfunktion spricht. Der portale Perfusionsdruck wurde in geringem Maße ebenfalls positiv beeinflusst. Der Algorithmus der IPostC scheint dabei keine Rolle zu spielen, denn der Effekt war für viele kurze Zyklen (8x20sec.) und wenige lange Zyklen (4x60sec.) annähernd gleich, wobei 4x60sec. den Vorteil des reduzierten Gewebestresses für die Gefäße mit sich bringt.

Zur Durchführung von „Folgeperfusionsen“ wurde das Perfusat der Reperfusion eines Ischämie-Versuches an der isolierten Rattenleber postkonditioniert (+ IPostC 4x60sec.) und nicht-postkonditioniert (- IPostC 4x60sec.) gesammelt, um anschließend damit eine zweite gesunde Leber zu perfundieren. So konnte nachgewiesen werden, dass das Perfusat nach der IPostC ein geringeres Schädigungspotenzial hat. Das weist darauf hin, dass nach der IPostC weniger Metaboliten, die einen Leberschaden und potenziell das Fortschreiten des IRI vermitteln, von der Leber in das Perfusat abgegeben werden.

Der positive Einfluss von IPostC auf die Mikrozirkulation während der Reperfusion wird durch die reduzierte Bildung von Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) nach IPostC im

Perfusat in allen Lebermodellen angedeutet.  $\text{TXB}_2$  ist der inaktive Metabolit des Vasokonstriktors Thromboxan  $\text{A}_2$ . Durch dessen Senkung werden die Sinusoidalräume in der Leber erweitert, so dass eine bessere Durchblutung der Sinusoide und Versorgung der Hepatozyten mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet ist.

*In vivo*-Daten zur IPostC mit 4x60sec. konnten den Schutz der Leber durch die Intervention bestätigen, denn die Transaminasen und die Laktatdehydrogenase konnten deutlich gesenkt werden. Zwei sehr wichtige Zytokine bei der Akkumulation und Aktivierung von Neutrophilen und Lymphozyten im Rahmen des IRI, der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) und Interleukin 6 (IL 6), konnten reduziert werden, so dass der Entzündungsprozess in der Leber abgeschwächt und der Gewebeschaden vermindert wurde. Dies bestätigt zusätzlich die Vermutung des geringeren Schädigungspotenzials im Perfusat nach IPostC, die sich aufgrund der „Folgeperfusionen“ ergeben hat.

Die Genexpressionen der *in vivo*-Versuche geben weitere Hinweise auf mögliche Mechanismen der IPostC. Unter der Hypothese einer geringeren Akkumulation und Aktivierung von Immunzellen nach IPostC, wurde *Ccl2* gemessen. Die reduzierte Expression dieses Chemokins nach IPostC bestätigt diesen Verdacht und spricht für eine abgeschwächte Infiltration von immunologisch aktiven Zellen in das Gewebe, was den Zellschaden minimiert.

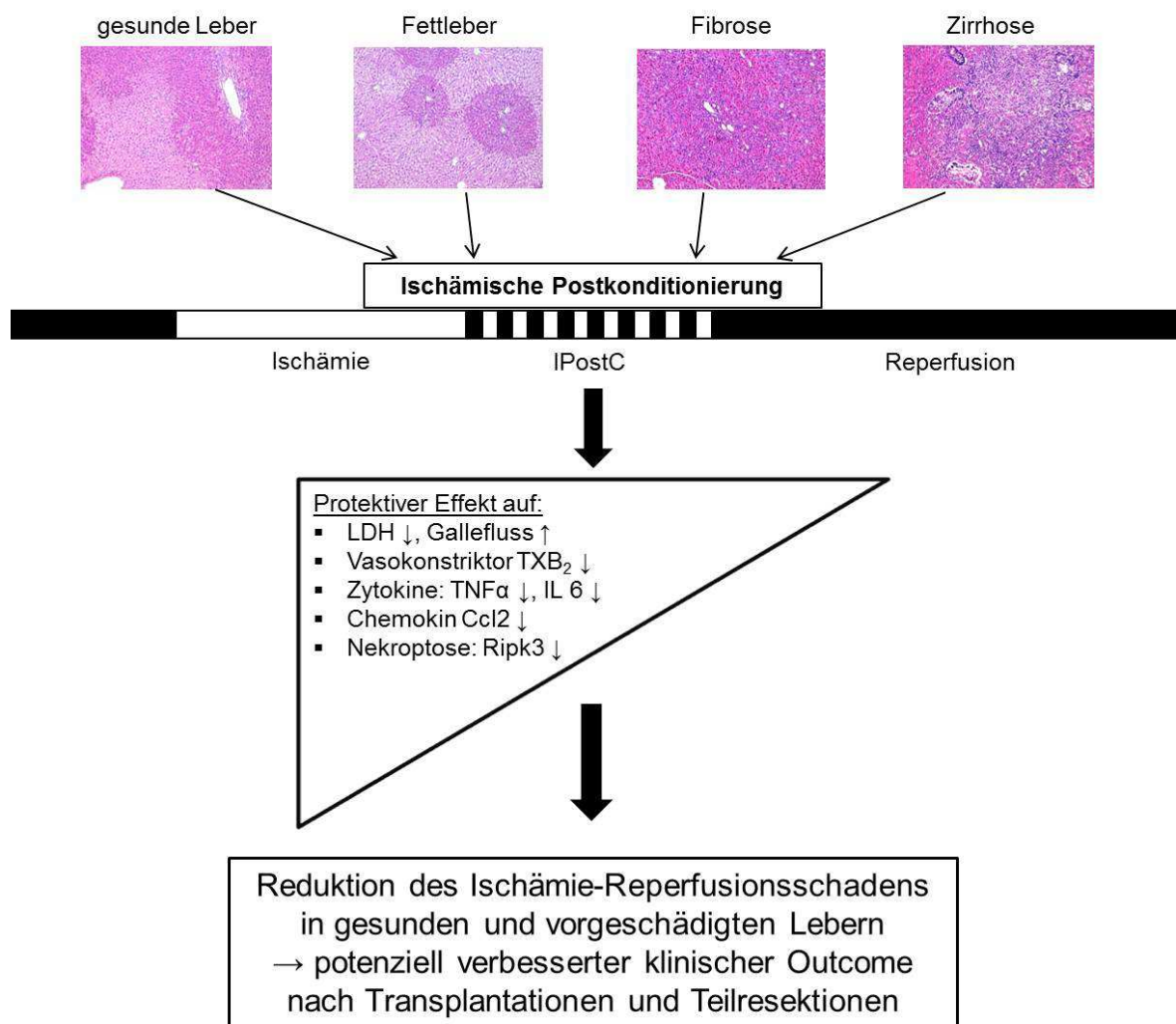
$\text{TNF}\alpha$  und IL 6 konnten, wie schon im Serum, auch in ihrer Expression im Lebergewebe mithilfe der IPostC gesenkt werden und deuten so ebenfalls auf eine reduzierte inflammatorische Reaktion der Leber aufgrund der Intervention hin.

Durch die Ermittlung der Expression der Rezeptor-interagierenden Proteinkinase 3 (*Ripk3*) im Lebergewebe, wurde der Anteil der Nekroptose, einer kontrollierten Nekrose, am Ausmaß des IRI und am Mechanismus der IPostC bestimmt. *Ripk3* bildet nach Aktivierung mit der Rezeptor-interagierenden Proteinkinase 1 (*Ripk1*) das Nekrosom und reguliert so die Nekroptose.

Eine verstärkte Expression nach warmer Ischämie und die Herunterregulierung der *Ripk3* nach IPostC weist darauf hin, dass der Zelluntergang des IRI zum Großteil durch Nekroptose ausgelöst wird und durch die IPostC wieder deutlich reduziert werden kann.

Zusammenfassend bietet die IPostC eine vielversprechende Möglichkeit zum Schutz der gesunden Leber sowie vorgeschädigten Lebern vor IRI (**Bild 6**).

Nach eingehender Prüfung im Rahmen von klinischen Studien, könnte diese Intervention den Organpool für Lebertransplantationen mit marginalen Organen erweitern und die Komplikationen bzw. die Organfunktion nach Leberresektionen verbessern.



**Bild 6: Zusammenfassende Darstellung der protektiven Wirkung von IPostC**

## 7 SUMMARY

The principle aim of this work entitled "Ischemic postconditioning (IPostC) as a new strategy to protect different models of liver diseases against ischemia-reperfusion-injury after cold and warm ischemia" was to evaluate the utility of ischemic postconditioning (IPostC) to attenuate or even protect the liver from ischemia-reperfusion injury (IRI) after both cold (model of transplantation) and warm (model of partial resection) ischemia. This new strategy is defined as a series of brief periods of ischemia and reperfusion applied immediately after the ischemic period (for transplantations in organ recipients), but before continuous reperfusion.

In this thesis we were particularly interested in fatty livers, which often have to be used as marginal organs due to the shortage of organs for liver transplantations, as well as in fibrotic and cirrhotic livers, which have to be subjected to partial resection as a result of hepatocellular carcinoma. So far neither for fatty livers nor for fibrotic and cirrhotic livers data exist regarding IPostC.

IPostC showed a protective effect after cold and warm ischemia in isolated rat liver perfusions in healthy livers as well as in previously damaged livers by reduced release of lactate dehydrogenase and increased bile flow. This indicates a reduced cell damage and improved organ function. The algorithm of IPostC seems to have no impact, because the effect of many short cycles (8x20sec) and a few long cycles (4x60sec) was approximately equal. The advantage of 4x60sec is reduced tissue injury around the clamped vessels.

In an follow-up study, we experimentally induced liver ischemia in two groups of rats (postconditioned with or without IPostC 4x60sec) and collected their reperfusion perfusate, which we subsequently used to perfuse a healthy rat liver. We found that the perfusate derived from the postconditioned rat group showed much more reduced damaging potential as opposed to the perfusate derived from the non-postconditioned rat group. We speculate that IPostC reduces the release of liver damaging metabolites into the perfusate, critically decreasing debilitating IRI.

The positive influence of IPostC on microcirculation during reperfusion is indicated by reduced formation of thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) in the perfusate after IPostC in all liver models. TXB<sub>2</sub> is the inactive metabolite of the vasoconstrictor thromboxane A<sub>2</sub>. By reduction of TXB<sub>2</sub> the blood flow in hepatic sinusoids is improved for better supply of hepatocytes with oxygen and nutrients.

*In vivo* data were able to confirm the protective capabilities of IPostC by reduced transaminases and lactate dehydrogenase in rats after the treatment. Furthermore, the levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL 6), two very important cytokines that have been implicated to play a role in IRI by accumulation and activation of neutrophils and lymphocytes, were significantly reduced, too. This indicates that inflammatory processes that otherwise would be damaging to the liver, were decreased. This observation is consistent with our description of reduced damage potential of the perfusate obtained from post conditioned IPostC.

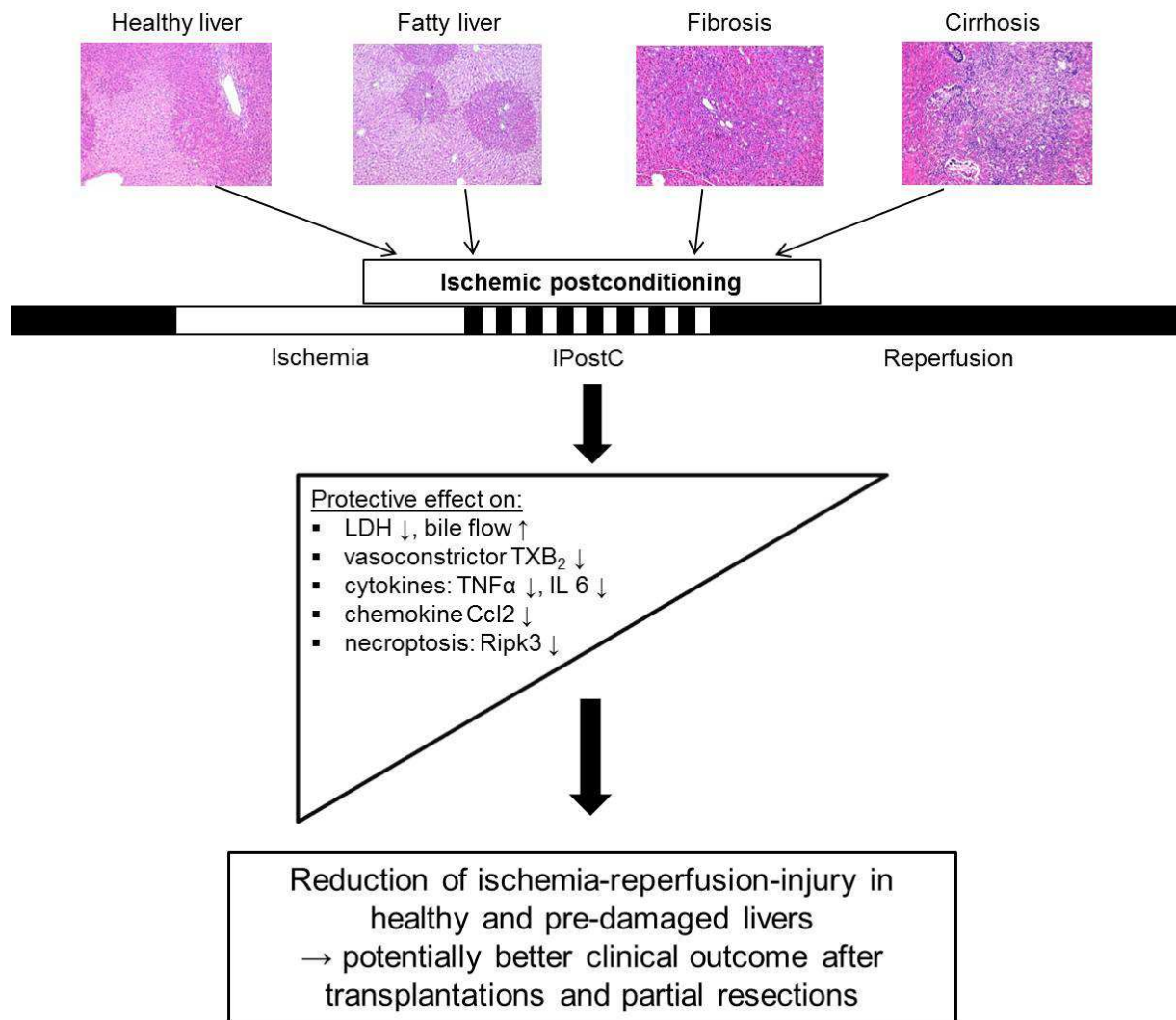
In an attempt to further understand the underlying molecular mechanisms behind IPostC, we examined the expression of several genes implicated in attenuating and mediating the immune response. With hypothesis of a lower accumulation and activation of immune cells by IPostC, Ccl2 was measured. Reduced expression of this chemokine by IPostC confirm this suspicion and point on attenuated infiltration of immunologically active cells into the tissue with minimizing the cellular damage.

Concomitant with this finding, we also showed reduced levels of TNF and IL 6 in liver tissue, confirming once again the immuno-protective properties of IPostC in liver ischemia.

Lastly, we studied the effects of warm ischemia and IPostC on the expression of the receptor-interacting protein kinase 3 (Ripk3) in liver tissue, which is associated with triggering necroptosis, a controlled necrosis. In general, activated Ripk3, together with the receptor-interacting protein kinase 1 (Ripk1) leads to formation of the necrosome and regulates necroptosis. After warm ischemia we found enhanced expression of Ripk3 indicating that necroptosis plays an important role in IR mediated cell damage. In contrast, Ripk3 gene expression was significantly reduced after IPostC and thus prevented liver tissue from necroptosis-induced cell degeneration.

In summary, IPostC offers a very promising way to protect healthy liver as well as pre-damaged livers from IRI (**Figure 7**). From a clinical point of view, this intervention may help expanding the organ pool for liver transplantations with marginal organs and reducing complications and improving graft function after liver resection.





**Figure 7: Summary of the protective effects of IPostC**

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Abu-Amara M, Gurusamy KS, Hori S, Glantzounis G, Fuller B, Davidson BR (2009):** Pharmacological interventions versus no pharmacological intervention for ischaemia reperfusion injury in liver resection surgery performed under vascular control. *Cochrane Database Syst Rev* (4): CD007472
- [2] **Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A (2010):** Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks-a review. *Liver Transpl* 16(9): 1016-1032
- [3] **Aihara T, Shiraishi M, Hiroyasu S, Hatsuse K, Mochizuki H, Seki S, Hiraide H, Muto Y (1998):** Ulinastatin, a protease inhibitor, attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury by downregulating TNF-alpha in the liver. *Transplant Proc* 30(7): 3732-3734
- [4] **Ali JM, Davies SE, Brais RJ, Randle LV, Klinck JR, Allison ME, Chen Y, Pasea L, Harper SF, Pettigrew GJ (2014):** Analysis of ischaemia/reperfusion injury in time-zero biopsies predicts liver allograft outcomes. *Liver Transpl.* accepted article
- [5] **Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M (2005):** Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 111(2): 194-197
- [6] **Bali A, Randhawa PK, Jaggi AS (2015):** Stress and opioids: role of opioids in modulating stress-related behavior and effect of stress on morphine conditioned place preference. *Neurosci Biobehav Rev*
- [7] **Banga NR, Homer-Vanniasinkam S, Graham A, Al-Mukhtar A, White SA, Prasad KR (2005):** Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg* 92(5): 528-538
- [8] **Baxter GF, Yellon DM (2003):** Current trends and controversies in ischemia-reperfusion research--meeting report of the Hatter Institute 3rd International Workshop on Cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 98(2): 133-136
- [9] **Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Bonvini JM, Lesurtel M, Ganter M, Weber A, Puhon MA, Clavien PA (2012):** Protection of pharmacological postconditioning in liver surgery: results of a prospective randomized controlled trial. *Ann Surg* 256(5): 837-844
- [10] **Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M (2006):** PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res* 69(1): 178-185
- [11] **Busuttil RW, Tanaka K (2003):** The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 9(7): 651-663

- [12] **Cantley LC (2002):** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573): 1655-1657
- [13] **Cao Z, Liu L, Van Winkle DM (2003):** Activation of delta- and kappa-opioid receptors by opioid peptides protects cardiomyocytes via KATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(3): H1032-1039
- [14] **Casillas-Ramírez A, Mosbah IB, Ramalho F, Rosello-Catafau J, Peralta C (2006):** Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 79(20): 1881-1894
- [15] **Casillas-Ramírez A, Zaouali A, Padriša-Altés S, Ben Mosbah I, Pertosa A, Alfany-Fernández I, Bintanel-Morcillo M, Xaus C, Rimola A, Rodés J, Roselló-Catafau J, Peralta C (2009):** Insulin-like growth factor and epidermal growth factor treatment: new approaches to protecting steatotic livers against ischemia-reperfusion injury. *Endocrinology* 150(7): 3153-3161
- [16] **Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC (2005):** Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 102(1): 102-109
- [17] **Chu MJ, Vather R, Hickey AJ, Phillips AR, Bartlett AS (2015):** Impact of ischaemic preconditioning on experimental steatotic livers following hepatic ischaemia-reperfusion injury: a systematic review. *HPB (Oxford)* 17(1): 1-10
- [18] **Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W (2003):** A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 238(6): 843-850; discussion 851-842
- [19] **Coito AJ, Buelow R, Shen XD, Amersi F, Moore C, Volk HD, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW (2002):** Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74(1): 96-102
- [20] **Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Anthony Thompson J, Eckhoff DE (2004):** Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. *Surgery* 136(2): 390-400
- [21] **Costa AD, Garlid KD (2008):** Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(2): H874-882
- [22] **Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, Critz SD (2005):** Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res* 97(4): 329-336

- [23] **Costa AD, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jaburek M, Garlid KD (2006):** The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(1): H406-415
- [24] **Crimi G, Pica S, Raineri C, Bramucci E, De Ferrari GM, Klersy C, Ferlini M, Marinoni B, Repetto A, Romeo M, Rosti V, Massa M, Raisaro A, Leonardi S, Rubartelli P, Oltrona Visconti L, Ferrario M (2013):** Remote ischemic post-conditioning of the lower limb during primary percutaneous coronary intervention safely reduces enzymatic infarct size in anterior myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JACC Cardiovasc Interv* **6**(10): 1055-1063
- [25] **Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Tsai BM, Morrell ED, Meldrum DR (2006):** Preconditioning versus postconditioning: mechanisms and therapeutic potentials. *J Am Coll Surg* **202**(5): 797-812
- [26] **Degli Esposti D, Sebahg M, Pham P, Reffas M, Pous C, Brenner C, Azoulay D, Lemoine A (2011):** Ischemic preconditioning induces autophagy and limits necrosis in human recipients of fatty liver grafts, decreasing the incidence of rejection episodes. *Cell Death Dis* **2**: e111
- [27] **Dendorfer A, Wolfrum S, Wagemann M, Qadri F, Dominiak P (2001):** Pathways of bradykinin degradation in blood and plasma of normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(5): H2182-2188
- [28] **Desai KK, Dikdan GS, Shareef A, Koneru B (2008):** Ischemic preconditioning of the liver: a few perspectives from the bench to bedside translation. *Liver Transpl* **14**(11): 1569-1577
- [29] **Donato M, D'Annunzio V, Berg G, Gonzalez G, Schreier L, Morales C, Wikinski RL, Gelpi RJ (2007):** Ischemic postconditioning reduces infarct size by activation of A1 receptors and K<sup>+</sup>(ATP) channels in both normal and hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* **49**(5): 287-292
- [30] **El-Badry AM, Moritz W, Contaldo C, Tian Y, Graf R, Clavien PA (2007):** Prevention of reperfusion injury and microcirculatory failure in macrosteatotic mouse liver by omega-3 fatty acids. *Hepatology* **45**(4): 855-863
- [31] **El-Badry AM, Jang JH, Elsherbiny A, Contaldo C, Tian Y, Raptis DA, Laczko E, Moritz W, Graf R, Clavien PA (2011):** Chemical composition of hepatic lipids mediates reperfusion injury of the macrosteatotic mouse liver through thromboxane A(2). *J Hepatol* **55**(6): 1291-1299
- [32] **Elias-Miró M, Massip-Salecedo M, Raila J, Schweigert F, Mendes-Braz M, Ramalho F, Jiménez-Castro MB, Casillas-Ramírez A, Bermudo R, Rimola A, Rodes J, Peralta C (2012):** Retinol binding protein 4 and retinol in steatotic and nonsteatotic rat livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia/reperfusion. *Liver Transpl* **18**(10): 1198-1208

- [33] **Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF (1999):** Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med (Berl)* **77**(8): 577-592
- [34] **Fondevila C, Hessheimer AJ, Maathuis MH, Munoz J, Taura P, Calatayud D, Leuvenink H, Rimola A, Ploeg RJ, Garcia-Valdecasas JC (2011):** Superior preservation of DCD livers with continuous normothermic perfusion. *Ann Surg* **254**(6): 1000-1007
- [35] **Freixa X, Bellera N, Ortiz-Perez JT, Jimenez M, Pare C, Bosch X, De Caralt TM, Betriu A, Masotti M (2012):** Ischaemic postconditioning revisited: lack of effects on infarct size following primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* **33**(1): 103-112
- [36] **Gao S, Andreeva K, Cooper NG (2014):** Ischemia-reperfusion injury of the retina is linked to necroptosis via the ERK1/2-RIP3 pathway. *Mol Vis* **20**: 1374-1387
- [37] **Garcia-Gil FA, Arenas J, Guemes A, Esteban E, Tome-Zelaya E, Lamata F, Sousa R, Jimenez A, Barrao ME, Serrano MT (2006):** Preservation of the liver graft with Celsior solution. *Transplant Proc* **38**(8): 2385-2388
- [38] **Garg V, Hu K (2007):** Protein kinase C isoform-dependent modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mitochondrial inner membrane. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(1): H322-332
- [39] **Garlid KD, Costa AD, Quinlan CL, Pierre SV, Dos Santos P (2009):** Cardioprotective signaling to mitochondria. *J Mol Cell Cardiol* **46**(6): 858-866
- [40] **Guan LY, Fu PY, Li PD, Li ZN, Liu HY, Xin MG, Li W (2014):** Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World J Gastrointest Surg* **6**(7): 122-128
- [41] **Guo JY, Yang T, Sun XG, Zhou NY, Li FS, Long D, Lin T, Li PY, Feng L (2011):** Ischemic postconditioning attenuates liver warm ischemia-reperfusion injury through Akt-eNOS-NO-HIF pathway. *J Biomed Sci* **18**:79
- [42] **Gurusamy KS, Gonzalez HD, Davidson BR (2010):** Current protective strategies in liver surgery. *World J Gastroenterol* **16**(48): 6098-6103
- [43] **Gurusamy KS, Kumar Y, Pamecha V, Sharma D, Davidson BR (2009):** Ischaemic pre-conditioning for elective liver resections performed under vascular occlusion. *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD007629
- [44] **Hahn JY, Song YB, Kim EK, Yu CW, Bae JW, Chung WY, Choi SH, Choi JH, Bae JH, An KJ, Park JS, Oh JH, Kim SW, Hwang JY, Ryu JK, Park HS, Lim DS, Gwon HC (2013):** Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial. *Circulation* **128**(17): 1889-1896

- [45] **Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang NP, Kin H, Payne CS, Sun HY, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ (2004):** Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg* **78**(3): 961-969
- [46] **Hausenloy DJ, Yellon DM (2006):** Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* **70**(2): 240-253
- [47] **Hausenloy DJ, Yellon DM (2008):** Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* **79**(3): 377-386
- [48] **Hausenloy DJ, Yellon DM (2009):** Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis* **204**(2): 334-341
- [49] **Heizmann O, Loehe F, Volk A, Schauer RJ (2008):** Ischemic preconditioning improves postoperative outcome after liver resections: a randomized controlled study. *Eur J Med Res* **13**(2): 79-86
- [50] **Hirano T, Ishihara K, Hibi M (2000):** Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* **19**(21): 2548-2556
- [51] **Hochhauser E, Pappo O, Ribakovsky E, Ravid A, Kurtzwald E, Cheporko Y, Lelchuk S, Ben-Ari Z (2008):** Recombinant human erythropoietin attenuates hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in an isolated mouse liver model. *Apoptosis* **13**(1): 77-86
- [52] **Hui W, Jinxiang Z, Heshui W, Zhuoya L, Qichang Z (2009):** Bone marrow and none-bone marrow TLR4 regulates hepatic ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* **13;389**(2): 328-332
- [53] **Iliodromitis EK, Downey JM, Heusch G, Kremastinos DT (2009):** What is the optimal postconditioning algorithm? *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **14**(4): 269-273
- [54] **Jaeschke H (2003):** Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**(1): G15-26
- [55] **Jaeschke H (2003):** Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J Invest Surg* **16**(3): 127-140
- [56] **Jang JH, Kang KJ, Kang Y, Lee IS, Graf R, Clavien PA (2008):** Ischemic preconditioning and intermittent clamping confer protection against ischemic injury in the cirrhotic mouse liver. *Liver Transpl* **14**(7): 980-988
- [57] **Jiang Y, Tang JJ, Wu BQ, Yuan B, Qu Z (2013):** The protective effects of different-time-ischemic preconditioning on the reperfusion injury in fatty livers in rats. *PLoS One* **8**(3): e58086

- [58] **Jiménez-Castro MB, Elias-Miro M, Mendes-Braz M, Lemoine A, Rimola A, Rodés J, Casillas-Ramírez A, Peralta C (2012):** Tauroursodeoxycholic acid effects PPAR $\gamma$  and TLR4 in steatotic liver transplantation. *Am J Transplant* **12**(12): 3257-3271
- [59] **Johnson G, Tsao PS, Lefer AM (1991):** Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. *Crit Care Med* **19**(2): 244-252
- [60] **Jones SA (2005):** Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* **175**(6): 3463-3468
- [61] **Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ (2004):** Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* **113**(11): 1535-1549
- [62] **Karatzas T, Neri AA, Baibaki ME, Dontas IA (2014):** Rodent models of hepatic ischemia-reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms. *J Surg Res* **191**(2): 399-412
- [63] **Kaur S, Jaggi AS, Singh N (2009):** Molecular aspects of ischaemic postconditioning. *Fundam Clin Pharmacol* **23**(5): 521-536
- [64] **Ke B, Shen XD, Lassman CR, Gao F, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW (2003):** Cytoprotective and antiapoptotic effects of IL-13 in hepatic cold ischemia/reperfusion injury are heme oxygenase-1 dependent. *Am J Transplant* **3**(9): 1076-1082
- [65] **Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao ZQ, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2005):** Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol* **100**(5): 404-412
- [66] **Kim WH, Lee JH, Ko JS, Min JJ, Gwak MS, Kim GS, Lee SK (2014):** Effect of remote ischemic postconditioning on patients undergoing living donor liver transplantation. *Liver Transpl* **20**(11): 1383-1392
- [67] **Kim YH, Yoon DW, Kim JH, Lee JH, Lim CH (2014):** Effect of remote ischemic post-conditioning on systemic inflammatory response and survival rate in lipopolysaccharide-induced systemic inflammation model. *J Inflamm (Lond)* **11**: 16
- [68] **Kim YI, Hiratsuka K, Kitano S, Joo DH, Kamada N, Sugimachi K (1996):** Simple in situ hypothermia reduced ischaemic injury to human liver during hepatectomy. *Eur J Surg* **162**(9): 717-721

- [69] **Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2004):** Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* **62**(1): 74-85
- [70] **Knudsen AR, Kannerup AS, Dich R, Funch-Jensen P, Gronbaek H, Kruhoffer M, Mortensen FV (2012):** Ischemic pre- and postconditioning has pronounced effects on gene expression profiles in the rat liver after ischemia/reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **303**(4): G482-489
- [71] **Knudsen AR, Kannerup AS, Gronbaek H, Dutoit SH, Nyengaard JR, Funch-Jensen P, Mortensen FV (2013):** Quantitative histological assessment of hepatic ischemia-reperfusion injuries following ischemic pre- and post-conditioning in the rat liver. *J Surg Res* **180**(1): e11-20
- [72] **Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR (2003):** Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* **20**(5): 383-396
- [73] **Krauss, Gerhard (veränd. 4.Auflage 2008):** Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. *Wiley-VCH*; ISBN 978-3-527-31397-6; S. 277/228, 268, 338/339
- [74] **Laleman W, Vander Elst I, Zeegers M, Servaes R, Libbrecht L, Roskams T, Fevery J, Nevens F (2006):** A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. *Eur J Clin Invest* **36**(4): 242-249
- [75] **Lehne K, Nobiling R (2013):** Metabolic preconditioning with fructose prior to organ recovery attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused rat liver. *Scand J Gastroenterol* **48**(2): 218-224
- [76] **Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM (2004):** Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* **79**(3): 502-509
- [77] **Lin HC, Lee TK, Tsai CC, Lai IR, Lu KS (2012):** Ischemic postconditioning protects liver from ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial permeability transition. *Transplantation* **93**(3): 265-271
- [78] **Linkermann A, Hackl MJ, Kunzendorf U, Walczak H, Krautwald S, Jevnikar AM (2013):** Necroptosis in immunity and ischemia-reperfusion injury. *Am J Transplant* **13**(11): 2797-2804
- [79] **Liu PG, He SQ, Zhang YH, Wu J (2008):** Protective effects of apocynin and allopurinol on ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol* **14**(18): 2832-2837



- [80] **Liu KX, Li YS, Huang WQ, Li C, Liu JX, Li Y (2009):** Immediate but not delayed postconditioning during reperfusion attenuates acute lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: comparison with ischemic preconditioning. *J Surg Res* **157**(1): e55-62
- [81] **Liu X, Chen H, Zhan B, Xing B, Zhou J, Zhu H, Chen Z (2007):** Attenuation of reperfusion injury by renal ischemic postconditioning: the role of NO. *Biochem Biophys Res Commun* **359**(3): 628-634
- [82] **Llacuna L, Fernández A, Montfort CV, Matías N, Martínez L, Caballero F, Rimola A, Elena M, Morales A, Fernández-Checa JC, García-Ruiz C (2011):** Targeting cholesterol at different levels in the mevalonate pathway protects fatty liver against ischemia-reperfusion injury. *J Hepatol* **54**(5): 1002-1010
- [83] **Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Yellon DM, Deanfield JE, MacAllister RJ (2006):** Postconditioning protects against endothelial ischemia-reperfusion injury in the human forearm. *Circulation* **113**(7): 1015-1019
- [84] **Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF (2014):** Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* **147**(4): 765-783 e764
- [85] **Marques TG, Chaib E, da Fonseca JH, Lourenco AC, Silva FD, Ribeiro MA Jr, Galvao FH, D'Albuquerque LA (2012):** Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection. *Acta Cir Bras* **27**(8): 589-594
- [86] **Marra F, Tacke F (2014):** Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* **147**(3): 577-594 e571
- [87] **Massip-Salcedo M, Rosello-Catafau J, Prieto J, Avila MA, Peralta C (2007):** The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int* **27**(1): 6-16
- [88] **Massip-Salcedo M, Zaouali MA, Padrisa-Altes S, Casillas-Ramirez A, Rodes J, Rosello-Catafau J, Peralta C (2008):** Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. *Hepatology* **47**(2): 461-472
- [89] **McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, Furrer K, Clavien PA (2007):** Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg* **245**(6): 923-930

- [90] **Meine MH, Zanutelli ML, Neumann J, Kiss G, de Jesus Grezzana T, Leipnitz I, Schlindwein ES, Fleck A, Gleisner AL, de Mello Brandao A, Marroni CA, Cantisani GP (2006):** Randomized clinical assay for hepatic grafts preservation with University of Wisconsin or histidine-tryptophan-ketoglutarate solutions in liver transplantation. *Transplant Proc* **38**(6): 1872-1875
- [91] **Miura T, Liu Y, Kita H, Ogawa T, Shimamoto K (2000):** Roles of mitochondrial ATP-sensitive K channels and PKC in anti-infarct tolerance afforded by adenosine A1 receptor activation. *J Am Coll Cardiol* **35**(1): 238-245
- [92] **Monbaliu D, Brassil J (2010):** Machine perfusion of the liver: past, present and future. *Curr Opin Organ Transplant* **15**(2): 160-166
- [93] **Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986):** Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**(5): 1124-1136
- [94] **Nakahata, N. (2008):** Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther* **118**(1): 18-35
- [95] **Ong SB, Samangouei P, Kalkhoran SB, Hausenloy DJ (2015):** The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* **78C**: 23-34
- [96] **Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R (2010):** Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* **87**(3): 406-423
- [97] **Pac-Soo CK, Mathew H, Ma D (2015):** Ischaemic conditioning strategies reduce ischaemia/reperfusion-induced organ injury. *Br J Anaesth* **114**(2): 204-216
- [98] **Papadopoulos D, Siempis T, Theodorakou E, Tsoulfas G (2013):** Hepatic ischemia and reperfusion injury and trauma: current concepts. *Arch Trauma Res* **2**(2): 63-70
- [99] **Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001):** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**(2): 153-183
- [100] **Peart JN, Headrick JP (2007):** Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways. *Pharmacol Ther* **114**(2): 208-221
- [101] **Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Losano G, Pagliaro P (2007):** Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovasc Res* **75**(1): 168-177

- [102] **Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J (1996):** Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* **229**(1): 264-270
- [103] **Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM, Gelpi E, Rosello-Catafau J (2001):** Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* **33**(1): 100-113
- [104] **Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J (1997):** Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* **25**(4): 934-937
- [105] **Peralta C, Jimenez-Castro MB, Gracia-Sancho J (2013):** Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol* **59**(5): 1094-1106
- [106] **Pine JK, Aldouri A, Young AL, Davies MH, Attia M, Toogood GJ, Pollard SG, Lodge JP, Prasad KR (2009):** Liver transplantation following donation after cardiac death: an analysis using matched pairs. *Liver Transpl* **15**(9): 1072-1082
- [107] **Polderman KH (2009):** Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med* **37**(7 Suppl): S186-202
- [108] **Rehni AK, Singh N (2007):** Role of phosphoinositide 3-kinase in ischemic postconditioning-induced attenuation of cerebral ischemia-evoked behavioral deficits in mice. *Pharmacol Rep* **59**(2): 192-198
- [109] **Reshef A, Sperling O, Zoref-Shani E (2000):** Opening of K(ATP) channels is mandatory for acquisition of ischemic tolerance by adenosine. *Neuroreport* **11**(3): 463-465
- [110] **Ryu SY, Peixoto PM, Teijido O, Dejean LM, Kinnally KW (2010):** Role of mitochondrial ion channels in cell death. *Biofactors* **36**(4): 255-263
- [111] **Saidi RF, Chang J, Verb S, Brooks S, Nalbantoglu I, Adsay V, Jacobs MJ (2007):** The effect of methylprednisolone on warm ischemia-reperfusion injury in the liver. *Am J Surg* **193**(3): 345-347; discussion 347-348
- [112] **Schattenberg JM, Galle PR (2010):** Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. *Dig Dis* **28**(1): 247-254
- [113] **Schlegel A, Rougemont Od, Graf R, Clavien PA, Dutkowski P (2013):** Protective mechanisms of end-ischemic cold machine perfusion in DCD liver grafts. *J Hepatol* **58**(2): 278-286

- [114] **Selzner M, Rudiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA (2000):** Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* **32**(6): 1280-1288
- [115] **Selzner N, Boehnert M, Selzner M (2012):** Preconditioning, postconditioning, and remote conditioning in solid organ transplantation: basic mechanisms and translational applications. *Transplant Rev* **26**(2): 115-124
- [116] **Selzner N, Liu H, Boehnert MU, Adeyi OA, Shalev I, Bartczak AM, Xue-Zhong M, Manuel J, Rotstein OD, McGilvray ID, Grant DR, Philips MJ, Levy GA, Selzner M (2012):** FGL2/fibroleukin mediates hepatic reperfusion injury by induction of sinusoidal endothelial cell and hepatocyte apoptosis in mice. *J Hepatol* **56**(1): 153-159
- [117] **Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA (2003):** Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* **125**(3): 917-936
- [118] **Simkhovich BZ, Przyklenk K, Kloner RA (2013):** Role of protein kinase C in ischemic "conditioning": from first evidence to current perspectives. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **18**(6): 525-532
- [119] **Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK, Schulz R, Kremastinos DT, Heusch G (2009):** Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic Res Cardiol* **104**(5): 469-483
- [120] **Soltys K, Dikdan G, Koneru B (2001):** Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* **34**(1): 13-18
- [121] **Somia N, Verma IM (2000):** Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet* **1**(2): 91-99
- [122] **Song X, Zhang N, Xu H, Cao L, Zhang H (2012):** Combined preconditioning and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury. *Int J Biol Sci* **8**(5): 707-718
- [123] **Sonnenday CJ, Warren DS, Cooke SK, Dietz HC, Montgomery RA (2004):** A novel chimeric ribozyme vector produces potent inhibition of ICAM-1 expression on ischemic vascular endothelium. *J Gene Med* **6**(12): 1394-1402
- [124] **Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, Andre-Fouet X, Ovize M (2005):** Postconditioning the human heart. *Circulation* **112**(14): 2143-2148
- [125] **Steib CJ, Gerbes AL, Bystron M, Op den Winkel M, Härtl J, Roggel F, Prüfer T, Göke B, Bilzer M (2007):** Kupffer cell activation in normal and fibrotic livers increases portal pressure via thromboxane A(2). *J Hepatol* **47**(2): 228-238

- [126] **Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ (2005):** Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**(4): H1900-1908
- [127] **Sun K, Liu ZS, Sun Q (2004):** Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning. *World J Gastroenterol* **10**(13): 1934-1938
- [128] **Sun K, Liu ZS, Sun Q (2009):** Protective effect of ischemic postconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **29**(12): 2480-2484
- [129] **Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL (2014):** Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci* **1319**: 82-95
- [130] **Szwarc I, Soullier S, Gayrard N, Mejean C, Mourad G, Argiles A (2007):** Ischemic postconditioning prevents ischemic acute renal failure. *Transplant Proc* **39**(8): 2554-2556
- [131] **Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T (2012):** Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **18**(19): 2300-2308
- [132] **Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, Kinoshita M (1999):** Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol* **33**(2): 556-564
- [133] **Tang L, Tian F, Tao W, Cui J (2007):** Hepatocellular glycogen in alleviation of liver ischemia-reperfusion injury during partial hepatectomy. *World J Surg* **31**(10): 2039-2043
- [134] **Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR (2008):** Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review. *J Surg Res* **150**(2): 304-330
- [135] **Tashiro H, Kuroda S, Mikuriya Y, Ohdan H (2014):** Ischemia-reperfusion injury in patients with fatty liver and the clinical impact of steatotic liver on hepatic surgery. *Surg Today* **44**(9): 1611-1625
- [136] **Toledo-Pereyra LH, Northrup WF, Humphrey EW, Najarian JS (1975):** Prevention of acute pulmonary edema during isolated perfusion for 24 hours. *Chest* **68**(4): 554-559
- [137] **Tong Y, Tang Z, Yang T, Yang Y, Yang L, Shen W, Chen W (2014):** Ulinastatin preconditioning attenuates inflammatory reaction of hepatic ischemia reperfusion injury in rats via high mobility group box 1(HMGB1) inhibition. *Int J Med Sci* **11**(4): 337-343

- [138] **Trevisani F, Colantoni A, Caraceni P, Van Thiel DH (1996):** The use of donor fatty liver for liver transplantation: a challenge or a quagmire? *J Hepatol* 24(1): 114-121
- [139] **Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM (2004):** Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 95(3): 230-232
- [140] **van den Akker EK, Hesselink DA, Manintveld OC, Lafranca JA, de Bruin RW, Weimar W, Ijzermans JN, Dor FJ (2014):** Ischemic postconditioning in human DCD kidney transplantation is feasible and appears safe. *Transpl Int* 27(2): 226-234
- [141] **Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F (2005):** Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 100(4): 295-310
- [142] **Wang J, Gao Q, Shen J, Ye TM, Xia Q (2007):** Kappa-opioid receptor mediates the cardioprotective effect of ischemic postconditioning. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 36(1): 41-47
- [143] **Wang JY, Shen J, Gao Q, Ye ZG, Yang SY, Liang HW, Bruce IC, Luo BY, Xia Q (2008):** Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Stroke* 39(3): 983-990
- [144] **Wang KX, Hu SY, Jiang XS, Zhu M, Jin B, Zhang GY, Chen B (2008):** Protective effects of ischaemic postconditioning on warm/cold ischaemic reperfusion injury in rat liver: a comparative study with ischaemic preconditioning. *Chin Med J (Engl)* 121(20): 2004-2009
- [145] **Wang N, Lu JG, He XL, Li N, Qiao Q, Yin JK, Ma QJ (2009):** Effects of ischemic postconditioning on reperfusion injury in rat liver grafts after orthotopic liver transplantation. *Hepatol Res* 39(4): 382-390
- [146] **Watanabe G, Uchinami H, Yoshioka M, Abe Y, Kikuchi I, Iwasaki W, Kume M, Yamamoto Y (2012):** Transfection of naked nuclear factor- $\kappa$ B decoy oligodeoxynucleotides into liver by rapid portal vein infusion in rats: its effect on ischemia-reperfusion injury of liver. *Hum Gene Ther* 23(4): 428-436
- [147] **Xia ZY, Gao J, Ancharaz AK (2009):** Protective effect of ischemic postconditioning on lung ischemia-reperfusion injury in rats and the role of heme oxygenase-1. *Chin J Traumatol* 12(3): 162-166
- [148] **Xing B, Chen H, Zhang M, Zhao D, Jiang R, Liu X, Zhang S (2008):** Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Stroke* 39(8): 2362-2369
- [149] **Yang H, Zhu YL, Liu QN, Zhou RS, Zhao G, Lu Y (2012):** The impact of ischemic postconditioning on the tumor necrosis factor- $\alpha$ /IL-6/signal transducers and activators of transcription-3 signal pathway of liver regeneration. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 50(10): 909-913

- [150] **Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV (2004):** Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* **44**(5): 1103-1110
- [151] **Yong J, Bo Y, Bao-qiang W, Jian-jun T, Zhen Q (2013):** The optimal time window of ischemic preconditioning (IPC) on the reperfusion injury in moderate to severe hepatocirrhosis in rats. *Ann Clin Lab Sci* **43**(1): 64-69
- [152] **Young SB, Pires AR, Boaventura GT, Ferreira AM, Martinho JM, Galhardo MA (2014):** Effect of ischemic preconditioning and postconditioning on liver regeneration in prepubertal rats. *Transplant Proc* **46**(6): 1867-1871
- [153] **Yun Y, Duan WG, Chen P, Wu HX, Shen ZQ, Qian ZY, Wang DH (2009):** Ischemic postconditioning modified renal oxidative stress and lipid peroxidation caused by ischemic reperfusion injury in rats. *Transplant Proc* **41**(9): 3597-3602
- [154] **Zatta AJ, Kin H, Lee G, Wang N, Jiang R, Lust R, Reeves JG, Mykytenko J, Guyton RA, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J (2006):** Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc Res* **70**(2): 315-324
- [155] **Zeng Z, Huang HF, Chen MQ, Song F, Zhang YJ (2010):** Postconditioning prevents ischemia/reperfusion injury in rat liver transplantation. *Hepatogastroenterology* **57**(101): 875-881
- [156] **Zeng Z, Huang HF, Chen MQ, Song F, Zhang YJ (2011):** Contributions of heme oxygenase-1 in postconditioning-protected ischemia-reperfusion injury in rat liver transplantation. *Transplant Proc* **43**(7): 2517-2523
- [157] **Zhao CM, Yang XJ, Yang JH, Cheng XJ, Zhao X, Zhou BY, Xu SD, Wang HF (2012):** Effect of ischaemic postconditioning on recovery of left ventricular contractile function after acute myocardial infarction. *J Int Med Res* **40**(3): 1082-1088
- [158] **Zhao K, Zhao GM, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW, Szeto HH (2004):** Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J Biol Chem* **279**(33): 34682-34690
- [159] **Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2003):** Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**(2): H579-588
- [160] **Zhong H, Gao Z, Chen M, Zhao J, Wang F, Li L, Dong H, Liu L, Wang Q, Xiong L (2013):** Cardioprotective effect of remote ischemic postconditioning on children undergoing cardiac surgery: a randomized controlled trial. *Paediatr Anaesth* **23**(8): 726-733

- [161] **Zhou W, Yuan J (2014):** Necroptosis in health and diseases. Semin Cell Dev Biol **35**: 14-23
- [162] **Zhu Y, Li J, Lv Y, Jing G (2012):** Effect of ischemic postconditioning on phosphatidylinositol-3-OH kinase and extracellular signal-regulated protein kinase in rats with hepatic ischemia-reperfusion injury. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao **32**(5): 677-680
- [163] **Zhu YL, Yang H, Liu QN, Zhang XQ, Zhao G, Lu Y (2012):** Effects of ischemic postconditioning on liver regeneration and energy metabolism in rats. Zhonghua Yi Xue Za Zhi **92**(37): 2601-2606



## 9 ANHANG

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
&	und
$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\delta$	delta
$\epsilon$	epsilon
$\kappa$	kappa
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
$\varsigma$	sigma
A.	Arteria
AChE	Acetylcholinesterase
Actb	Aktin, beta
AG	Aktiengesellschaft
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death
Bag	B-Zellen-Lymphom-2-assoziiertes Athanogen (Bcl-2-associated athanogene)
Bcl	B-Zellen-Lymphom (B-cell-lymphoma)
BDL	Gallengangsligatur (bile duct ligation)
B2m	Beta-2 Mikroglobulin
c	Zenti ( $10^{-2}$ )
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid

Casp	Caspase
Ccl2	Chemokin (C-C Muster) Ligand 2
CDAMP	Zelltod-assoziierte molekulare Muster
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EvG	Elastica-van-Gieson
FGL	Fibrinogen-ähnlich (fibrinogen-like)
JAK	Januskinase
g	Gramm oder Beschleunigungskraft
gDNA	genomische DNA
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GPGR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase-3
h	Stunde
H	Wasserstoff
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMGB	High Mobility Group Box
H <sub>2</sub> O	Wasser
HO	Hämoxygenase
HFD	High fat diet
HRP	Meerrettichperoxidase

HSC	Hepatische Sternzelle
HTK-Lösung	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INF	Interferon
IPC	Direkte ischämische Präkonditionierung
IPostC	Ischämische Postkonditionierung
IRI	Ischämie-Reperfusionsschaden
k	Kilo ( $10^3$ )
KC	Kupfferzelle
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH-Medium	Krebs-Henseleit-Medium
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Dikaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Milli ( $10^{-3}$ ) oder Meter
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
$\text{MgSO}_4$	Magnesiumsulfat
min.	Minute
$\text{mK}_{\text{ATP}}$	mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal
mPTP	Mitochondrien-Permeabilitäts-Transitions- Poren
MW	Molekulargewicht
n	nano ( $10^{-9}$ ) oder Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid

NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NLRP	NOD-ähnliche Pyrin-Domäne enthaltene Rezeptorfamilie 3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3)
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	piko (10 <sup>-12</sup> ) oder Signifikanzwert
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
post op	nach der Operation
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RIPC	Indirekte ischämische Präkonditionierung (remote ischemic preconditioning)
Ripk	Rezeptor-interagierende Proteinkinase
RIPostC	Indirekte ischämische Postkonditionierung
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
SEC	Sinusendothelzelle
SEM	Standard error of the mean
sER	glattes endoplasmatisches Retikulum

sec.	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
SOD	Superoxiddismutase
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SYBR Green	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl- 1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl}- 3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
TAA	Thioacetamid
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (toll-like receptor)
TNF	Tumornekrosefaktor
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	Thromboxan B <sub>2</sub>
U	Unit
UK	United Kingdom
UW	University of Wisconsin
V.	Vena
VCAM	Vaskuläres Adhäsionsmolekül (vascular adhesion molecule)
Wo.	Wochen
XDH	Xanthin-Dehydrogenase
XOD	Xanthin-Oxidase

## 9.2 Veröffentlichungen

### Abstracts:

**Schewe J, Liss I, Selzner L, Makeschin MC, Goeke B, Gerbes AL, Steib CJ:** Ischemic postconditioning (IPostC) in fibrotic livers following warm ischemia: a new strategy to protect the liver against ischemia-reperfusion injury; 64th Annual meeting of the AASLD, November 2014 in Boston MA; Abstract/Poster

**Schewe J, Selzner L, Liss I, Goeke B, Gerbes AL, Steib CJ:** Ischämische Postkonditionierung (IPostC) bei fibrotischen Lebern nach warmer Ischämie: eine neue Strategie zum Schutz der Leber vor Ischämie-Reperfusionsschäden; 69. Jahrestagung der DGVS, September 2014 in Leipzig; Abstract/Kurzvortrag

**Schewe J, Selzner L, Liss I, Gerbes AL, Steib CJ:** Ischemic postconditioning (IPostC): a new strategy to protect the liver against ischemia-reperfusion injury; 63th Annual meeting of the AASLD, November 2013 in Washington DC; Abstract/Poster

**Schewe J, Leistner N, Liß I, Gerbes AL, Steib CJ:** Ischämische Postkonditionierung (IPostC): Eine neue Strategie zum Schutz vor Ischämie-Reperfusionsschäden der Leber; 68. Jahrestagung der DGVS, September 2013 in Nürnberg; Abstract/Freier Kurzvortrag

### Co-Autorschaften:

**op den Winkel M, Gmelin L, Schewe J, Leistner N, Bilzer M, Goeke B, Gerbes AL, Steib CJ (2013):** Role of cysteinyl-leukotrienes for portal pressure regulation and liver damage in cholestatic rat livers. Lab Invest **93**(12): 1288-1294

**Steib CJ, Gmelin L, Pfeiler S, Schewe J, Brand S, Goeke B, Gerbes AL (2013):** Functional relevance of the cannabinoid receptor 2 - heme oxygenase pathway: a novel target for the attenuation of portal hypertension. Life Sci **93**(16): 543-551

## 10 DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt meiner Arbeitsgruppe mit meinem Mentor PD Dr. Christian Steib an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II für die Überlassung dieses sehr interessanten und klinisch relevanten Themas und die exzellente Betreuung mit immer wieder neuen Anregungen und Ideen. Auch unsere technischen Assistenten Ingrid Liss, Lisa Selzner und Natalie Leistner haben mich jederzeit in allen methodischen Schwierigkeiten tatkräftig unterstützt.

Prof. Dr. Eckhard Wolf möchte ich für die Mitbetreuung meiner Dissertation danken, da er mir so die Möglichkeit gegeben hat diese an der Tierärztlichen Fakultät einzureichen.

Für die immer äußerst schnelle und ausgezeichnete Anfertigung und Auswertung aller unserer histologischen Schnitte, möchte ich ganz herzlich Dr. Marie-Christine Makeschin und Prof. Dr. Doris Mayr danken.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Alexander Gerbes, der im Rahmen einer Forschergruppe einen regen Austausch unserer Experimente und Daten mit anderen hochqualifizierten Wissenschaftlern auf dem Gebiet der Hepatologie ermöglicht und so stetig zur Weiterentwicklung des Projektes beigetragen hat. Auch allen anderen Mitgliedern der Forschergruppe möchte ich danken, besonders Prof. Dr. Simon Rothenfußer für die grandiose Idee der Folgeperfusionen.

Der DFG danke ich für die Bewilligung und finanzielle Unterstützung meines Projektes.

Eine Vielzahl von Kollegen anderer Arbeitsgruppen der Medizinischen Klinik und Poliklinik II standen mir ebenfalls jederzeit beratend zur Seite. Ich danke Sabine Pirsig der AG Benesic, die so ziemlich jede Methode kennt und deshalb auch so ziemlich jede Frage dazu beantworten kann sowie Ralf Wimmer, Lena Wottke und Renate Artmann von der AG Denk, deren Geräte mir immer zur Verfügung standen. Ein ganz besonderer Dank geht an Andrea Ofner und Maximilian Marschall der AG Kolligs, die mir nicht nur in wissenschaftlichen Fragestellungen geholfen haben, sondern auch außerhalb des Labors vor allem emotional eine große Stütze waren. Ebenso wie Isabel Thalhammer, der ich für ihre Korrekturen dieser Arbeit danke.

Den wichtigsten Ausgleich zur Promotion gab mir über die gesamte Zeit meine liebe Familie. Ein herzliches Dankeschön dafür an meine Mama, meine Schwester und meine Großeltern sowie an Jens, Jonas und Paul Buchholz.